



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MALIGNAS RECORRENDO ÀS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

Trabalho submetido por
Ana Marta Vaz Castanheira Freire Ferreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MALIGNAS RECORRENDO ÀS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

Trabalho submetido por
Ana Marta Vaz Castanheira Freire Ferreira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Evguenia Bekman

novembro de 2017

Dedicatória

“If you can dream it, you can do it.

Remember that this whole thing started with a dream and a mouse.

And so, after much waiting, on a day like any other, I decided to triumph ...

I decided not to wait for the opportunities and, yes, to pick them up myself.

I decided to see each problem as an opportunity to find a solution.

I decided to see each desert as a possibility to find an oasis.

I decided to see each night as a mystery to solve.

I decided to see each day as a new opportunity to be happy.

That day I discovered that my only rival was no more than my own limitations and that

to face them was the only and the best way to overcome them.

That day, I discovered that I was not the best and that perhaps I had never been.

I no longer care about who wins or loses.

Now I just care to know better what to do.

I learned that the difficult thing is not to get up there, but to stop climbing.

I learned that the best triumph is to be able to call someone a friend.

I discovered that love is more than a simple state of falling in love, love is a philosophy

of life.

That day, I ceased to be a reflection of my past few triumphs and I became a dim light

in the present.

I learned that it is useless to be light if it does not light the way of others.

On that day, I decided to change so many things ...

On that day, I learned that dreams exist to come true.

And since that day I no longer sleep to rest ... I simply sleep to dream.”

Walt Disney

Agradecimentos

A vida encarrega-se de nos fazer superar tudo o que acha necessário para atingirmos os nossos objetivos e também de nos recompensar quando estes são cumpridos. É principalmente a concretização de um sonho e de um objetivo de vida.

Quero agradecer, do fundo do meu coração às pessoas que tornaram tudo isto possível, a minha mãe Ana Paula e a minha avó Odete, sem elas não me tinha tornado a pessoa que sou hoje e não tinha chegado tão longe. A elas dedico tudo o que conquistei ao longo desta jornada. Agradecer ao meu avô, Sebastião, que me deixou demasiado cedo, mas que sempre acreditou e soube que eu era capaz e aqui está a minha promessa cumprida.

Obrigada ao meu filho, Santiago, que fez com que tudo este percurso tivesse um objetivo e uma força ainda maior e fez com que tudo se tornasse ainda mais intenso e emotivo. Realmente, nós fazemos e conseguimos tudo pelos nossos filhos e eles sem duvida são a melhor coisa nas nossas vidas.

Quero agradecer ao meu namorado, Sérgio, que sempre esteve presente, nunca baixando os braços, tanto nos momentos em que a minha vontade era somente desistir, que me deu aquela força incondicional e os melhores conselhos para continuar a perseguir os meus objetivos e também nas minhas conquistas e vitórias, estiveste sempre lá para me felicitar. Um muito obrigado por continuares sempre do meu lado.

Agradecer a todos aqueles os que me acompanharam por este percurso fora, pois foram eles que na ausência de outros me apoiaram e foram sem dúvida os alicerces para este sucesso, aos que apesar de amigos considero como família e sempre sem nunca hesitar estiveram lá e nunca me deixaram baixar os braços, entre risos e choros sempre me deram a mão, a vocês o meu sincero obrigado.

Obrigada aos mais distantes porque também eles fizeram parte deste percurso e também eles deixaram um bocadinho deles em mim e em tudo isto.

Um muitíssimo obrigado à minha excelente orientadora a professora, Evguenia Bekman, que me acolheu e orientou da melhor forma.

Que se encerre este capítulo levando tudo o que se pode no coração e no pensamento e que se comece outro com o entusiasmo e determinação de sempre. A vida não começa agora, a vida já começou há muito tempo. As conquistas já foram muitas, mas mais ainda estarão para vir. Obrigada Egas Moniz, Obrigada Ciências Farmacêuticas.

Resumo

Presentemente, as doenças hemato-oncológicas estão na ordem do dia e são das que mais têm preocupado os profissionais de saúde, como tal têm sido contínuos os esforços para obterem a melhor forma as combater. As células estaminais provenientes do sangue do cordão umbilical têm sido uma das fontes usadas para o tratamento destas doenças. A primeira transplantação recorrendo a estas células, nos anos 80, promoveu a utilização desta terapia e depois desse, múltiplos transplantes foram efetuados, afirmando que a terapia recorrendo às células progenitoras hematopoiéticas deveria ser uma hipótese a considerar para o tratamento destas patologias. Inúmeras pesquisas com células estaminais do sangue do cordão umbilical evidenciam resultados promissores que em breve irão induzir um aumento do seu uso a várias doenças, nomeadamente doenças com natureza degenerativa. A evidência de que a criopreservação não modifica a viabilidade destas células possibilita que sejam conservadas por longos períodos de tempo e apenas sejam usadas quando é essencial.

Com a compreensão da capacidade regenerativa das células estaminais do sangue do cordão umbilical aparecem em Portugal e a nível mundial bancos de recolha e criopreservação tanto públicos como privados.

É extremamente necessária, a contínua investigação numa área tão importante como a das neoplasias. Cada vez existem mais informações sobre as suas causas, sobre a forma como se propaga e como progride. Estão a ser analisadas novas formas de prevenir, descobrir e tratar as neoplasias, como é o caso da transplantação com células hematopoiéticas progenitoras, sempre de modo a melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas por estas patologias.

Palavras-chave: neoplasias, células estaminais, sangue do cordão umbilical, criopreservação.

Abstract

Presently, hemato-oncological diseases are the order of the day and are the ones that have most worried healthcare professionals, as such efforts have been continuous to obtain the best way to fight them. Stem cells from umbilical cord blood have been one of the sources used to treat these diseases. The first transplantation using these cells back in the 80's promoted the use of this therapy and after that, multiple transplants were performed, stating that the therapy using hematopoietic progenitor cells should be a hypothesis to be considered for the treatment of these pathologies. Numerous stem cell researches in umbilical cord blood have shown promising results in predicting an increase in its use for various diseases, including degenerative ones. Evidence that cryopreservation does not modify the viability of these cells allows them to be retained for long periods of time allowing them to be used on demand.

With the understanding of the regenerative capacity of umbilical cord blood stem cells, both public and private collection and cryopreservation banks appear in Portugal and worldwide.

Continuing the research in such an important area as neoplasias is extremely necessary. There is more and more information about their causes, how they spread and how they work. New ways of preventing, discovering and treating neoplasias, such as transplantation with progenitor hematopoietic cells, are being analyzed, always in order to improve the quality of life of people affected by these pathologies.

Key-words: neoplasias, stem cells, umbilical cord blood, cryopreservation.

Índice Geral

INTRODUÇÃO	13
SISTEMA HEMATOPOIÉTICO	15
ORIGEM.....	15
CÉLULAS ESTAMINAIS.....	17
CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS	18
<i>Potencialidade</i>	<i>18</i>
<i>Origem</i>	<i>19</i>
CÉLULAS ESTAMINAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL	23
<i>Características</i>	<i>24</i>
NEOPLASIAS	29
TIPOS DE NEOPLASIAS.....	31
LEUCEMIA	31
CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS	32
LEUCEMIA AGUDA	32
<i>Leucemia Mielóide Aguda (LMA).....</i>	<i>33</i>
<i>Leucemia linfocítica aguda (LLA)</i>	<i>33</i>
LEUCEMIAS CRÔNICAS	35
<i>Leucemia Mielóide Crônica (LMC)</i>	<i>35</i>
<i>Leucemia linfocítica crônica (LLC).....</i>	<i>35</i>
LINFOMA	37
<i>Linfoma Não-Hodgkin (LNH).....</i>	<i>38</i>
<i>Linfoma de Burkitt</i>	<i>38</i>
<i>Linfoma de Hodgkin.....</i>	<i>39</i>
MIELOMA MÚLTIPLO	41
TRANSPLANTAÇÃO	43
VISÃO GLOBAL.....	44
AUTOTRANSPLANTE	45
ALOTRANSPLANTE	46
APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS.....	46
TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS DO CORDÃO UMBILICAL	51
APLICAÇÕES CLÍNICAS	51
VANTAGENS	53
DESVANTAGENS	55
RESULTADOS	57
CONCLUSÃO	59
BIBLIOGRAFIA	61

Índice de Tabelas

<u>Tabela nº1:</u> Principais neoplasias e respetivas células de origem.....	pág.29
<u>Tabela nº2:</u> Indicadores de mortalidade relativa ao Linfoma não-Hodgkin, em Portugal.....	pág.39
<u>Tabela nº3:</u> Dados da EUCAN estimados de incidência, mortalidade e prevalência do Linfoma de Hodgkin em Portugal.....	pág.40
<u>Tabela nº4:</u> Dados da EUCAN das estimativas sobre incidência, mortalidade e prevalência do mieloma múltiplo em Portugal.....	pág.42
<u>Tabela nº5:</u> Patologias com aplicação terapêutica das UCBSCs.....	pág.53
<u>Tabela nº6:</u> Vantagens da utilização de UCBSCs.....	pág.55
<u>Tabela nº7:</u> Desvantagens da utilização de UCBSCs.....	pág.57

Índice de figuras

<u>Figura nº1:</u> A Hematopoiese.....	pág.15
<u>Figura nº2:</u> Potencialidade das células estaminais.....	pág.19
<u>Figura nº3:</u> Processo de divisão das células hematopoiéticas.....	pág.22
<u>Figura nº4:</u> Principais fontes de células estaminais.....	pág.24
<u>Figura nº5:</u> Constituição do cordão umbilical.....	pág.26
<u>Figura nº6:</u> Gráfico da evolução de taxas de mortalidade bruta e padronizada de tumores malignos em Portugal (2010-2015).....	pág.30
<u>Figura nº7:</u> Gráfico referente ao número total de cirurgias oncológicas em Portugal (2010-2015).....	pág.31
<u>Figura nº8:</u> Células de Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS).....	pág.40
<u>Figura nº9:</u> Transplantes de células estaminais hematopoiéticas (1988-2006) nos EUA.....	pág.44
<u>Figura nº10:</u> Número de unidades de cordão umbilical armazenado por ano, a nível mundial.....	pág.49

Lista de Abreviaturas

SCs – Stem Cells

iPSCs – *induced Pluripotent Stem Cells*

EpiSC- *Epiblast Stem Cells*

SSCs – *Somatic Stem Cells* (Células estaminais somáticas)

HSCs – *Hematopoietic Stem Cells*

MSC – *Mesenchymal Stem Cells*

NK – *Natural-Killer*

HSCsLt- *Hematopoietic stem cells Long term*

HSCsSt - *Hematopoietic stem cells Short Term*

MPP - *Multipotent progenitor cells*

UBCSCs – *Umbilical Cord Blood Stem Cells*

HLA- *Human Leukocyte Antigens*

HvGD - *Host versus Graft Disease*

GvHD – *Graft versus host disease*

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LLA - Leucemia linfocítica Aguda

LLC – Leucemia linfocítica Crónica

LMC - Leucemia Mieloide Crónica

LH - Linfoma de Hodgkin

LNH – Linfoma de Não-Hodgkin

VEB – Virus de Epstein-Barr

Introdução

A hematopoiese é um complexo processo que assegura uma constante formação, proliferação e maturação das células sanguíneas ao longo da vida do organismo, tendo por base processos mitóticos e de diferenciação celular que ocorrem nos órgãos hematopoiéticos. A hematopoiese pode ser dividida em 3 fases. Nos humanos, a fase mesoblástica, ou hematopoiese embrionária ocorre nas primeiras semanas de gestação no saco vitelino do embrião, iniciando o seu declínio à sexta semana e cessando no segundo mês. Nesta fase formam-se eritroblastos primitivos. A fase hepática decorre entre as seis semanas e os sete meses, com a formação de eritroblastos definitivos, denominados eritrócitos. A partir do terceiro mês a hematopoiese também ocorre no baço. O fígado e o baço são órgãos hematopoiéticos onde decorre a produção sequencial de linfócitos, dos megacariócitos (plaquetas) e dos granulócitos. A última fase deste processo denomina-se fase medular, fase esta que acontece entre o sexto e o sétimo mês de vida do feto e onde a medula óssea se torna o principal órgão hematopoiético, papel esse que vai desempenhar após término da gestação (Jagannathan-Bogdan & Zon, 2013; Junqueira & Carneiro, 2008).

É também necessário um breve destaque às células estaminais (SCs, *Stem Cells*), estas são células indiferenciadas com a capacidade de proliferarem e de se diferenciarem em diversos tipos celulares no organismo, assegurando a homeostase dos tecidos ao longo da vida. A sua proliferação está sob um controlo apertado e pode ser desencadeada por diversos fatores internos e externos (Eaves, 2015).

A investigação em SCs nas últimas décadas veio a adquirir um considerável destaque científico, social e económico tanto no sentido de conhecer melhor os mecanismos de desenvolvimento dos organismos vivos, bem como na procura de tratamentos inovadores de doenças para as quais ainda não há cura eficaz (Regateiro et al., 2005).

Sistema Hematopoiético

Origem

Nos humanos adultos, os eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas são formados a partir das células-tronco ou células estaminais hematopoiéticas (HSCs) da medula óssea. De acordo com o glóbulo formado, o processo recebe os seguintes nomes: eritropoiese, granulocitopoiese, linfopoiese, monocitopoiese e megacariocitopoiese. Estas células atravessam várias fases de diferenciação e maturação na medula óssea, antes de se dirigirem para o sangue, como demonstra a figura nº 1 (Junqueira & Carneiro, 2008).

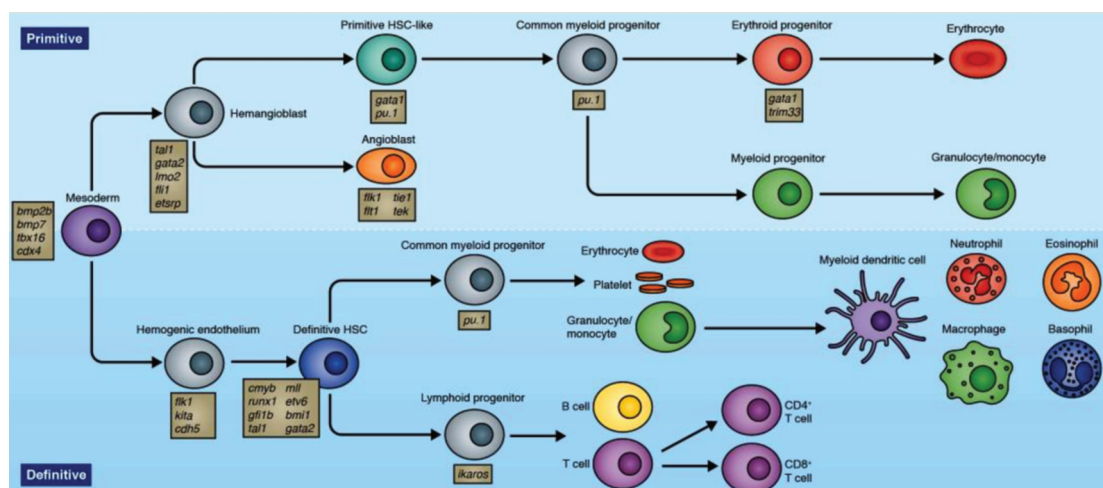


Figura nº1: A hematopoiese, adaptado de (Jagannathan-Bogdan & Zon, 2013)

Os órgãos hematopoiéticos são classificados como primários (medula óssea e timo) e secundários. Todas as células são originárias primariamente da medula óssea, onde residem as células hematopoiéticas que tem a capacidade de proliferação ilimitada. Os linfócitos B diferenciam-se na medula óssea, enquanto que os linfócitos T descendem de células que migram da medula para o timo e ali se diferenciam (Junqueira & Carneiro, 2008).

As células estaminais são células de origem embrionária, fetal ou do adulto, com capacidade de se dividirem ilimitadamente e de se diferenciarem em vários tipos celulares. Para conseguir manter essas duas capacidades, uma célula estaminal pode

dividir-se originando uma célula igual e outra que vai seguir a via da diferenciação (Brasileira, Hematologia, & Review, 2009).

De acordo com dados experimentais, as células estaminais possuem três características que as distinguem dos outros tipos de células: têm a capacidade de se diferenciar em células especializadas quando sujeitas a determinadas circunstâncias fisiológicas ou experimentais; na ausência de estímulo mantêm-se indiferenciadas; são capazes de se autorrenovarem indefinidamente (Weissman, 2000).

Células estaminais

As células estaminais, SCs, são células indiferenciadas com a capacidade de dar origem a distintas gerações celulares tendo a aptidão de se diferenciar em células especializadas e de se dividir indefinidamente. A multiplicação das SCs sucede através de consecutivas mitoses, sendo este processo responsável por garantir um número adequado de SCs (Breu, Guggenbichler, & Wollmann, 2008; Seita, Jun; Weissman, 2010).

A autorrenovação é o processo pelo qual as SCs geram células-filhas rigorosamente iguais às células progenitoras através de divisões celulares sucessivas. A capacidade de diferenciação é o potencial que as SCs apresentam, sob certos requisitos fisiológicos e/ou experimentais, de criar determinados tipos celulares diferenciados (Breu et al., 2008; Junqueira & Carneiro, 2008).

Estas podem ser classificadas, de acordo com a sua origem em células estaminais embrionárias e células estaminais não embrionárias ou adultas, e pela sua potencialidade ou capacidade de diferenciação em pluripotentes, totipotentes e multipotentes (Patel, Shah, & Srivastava, 2013).

Em função destas características, existem estudos que corroboram a possibilidade de uso das SCs para a cura ou para o tratamento de diversas doenças, através da substituição dos tecidos degenerados (Breu et al., 2008; Junqueira & Carneiro, 2008; Waller-Wise, 2011).

As principais fontes de células estaminais adultas são o sangue do cordão umbilical, a medula óssea e o sangue periférico. Em Portugal o primeiro transplante realizado com células estaminais do sangue do cordão umbilical que foram criopreservadas num banco privado português, foi realizado a 19 de Fevereiro de 2007, no IPO do Porto numa criança de 14 meses com leucemia linfoblástica aguda, tendo sido muito bem-sucedido (Junqueira & Carneiro, 2008; Regateiro et al., 2005; Weissman, 2000).

Classificação das células estaminais

Potencialidade

Como já referido anteriormente, as células estaminais são classificadas em função da potencialidade em pluripotentes, totipotentes e multipotentes.

As células pluripotentes tem a capacidade de se diferenciar em quase todos os tecidos humanos germinativos (ectoderme, mesoderme e endoderme), exceto placenta e anexos embrionários, podendo ser isolados a partir do botão embrionário do blastocisto (Watt & Driskell, 2010).

As células totipotentes são o zigoto e os primeiros blastómeros que derivam da divisão celular deste, sendo capazes de dar origem a qualquer tipo de célula ou tecido que constitui o embrião e que o suporta durante o seu desenvolvimento, incluindo tecidos extraembrionários. Do ponto de vista biológico as células totipotentes são totalmente indiferenciadas, estágio que equivale à máxima competência de diferenciação. O ovo fertilizado é a célula com maior potencial de diferenciação, no entanto, não pode ser considerado uma célula estaminal por não ter capacidade de autorrenovação (Watt & Driskell, 2010; Welniak, Blazar, & Murphy, 2007).

As células multipotentes têm capacidade de originar vários tipos celulares, como por exemplo, células estaminais hematopoiéticas que originam todas as células dos sistemas sanguíneo e linfático, ou seja, plaquetas, glóbulos brancos e vermelhos. Células multipotentes geralmente têm um potencial de diferenciação limitado de acordo com o órgão do qual resultam, gerando unicamente as células daquele órgão. Estas células que estão presentes no indivíduo adulto e são extremamente importantes para a homeostase do órgão onde pertencem. Ao longo do desenvolvimento de um organismo as células perdem a pluripotência e especializam-se, passando a constituir tecidos específicos. O seu potencial passa a ser mais restrito, sendo então multipotentes ou células progenitoras adultas, cuja função é a reparação e a manutenção tecidual (Fabr, 2012; Pessoa, 2014).

Alguns tipos de células maduras podem, em certas condições, ser reprogramadas em células pluripotentes, designadas por células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs), descobertas em 2006 por Takahashi e Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006). As iPSCs detêm propriedades de auto-renovação favoráveis tal como as células

estaminais embrionárias, assim como a possibilidade de serem geradas a partir das células do próprio doente, o que lhes defere o enorme potencial em futuras terapêuticas (Stein et al., 2010).

Conforme o estudo preconizado por Shinya Yamanaka, em 2006 foi demonstrado que a adição exógena de apenas quatro fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 e Myc) reprogramava os fibroblastos de ratinhos em estado embrionário, obrigando-os a expressar genes responsáveis pela indiferenciação celular. As iPSCs assim obtidas revelam ser idênticas às células estaminais embrionárias e demonstram uma enorme habilidade de manterem em cultura durante várias passagens. A figura nº2 ilustra as diferentes fontes da potencialidade das células estaminais que ocorrem naturalmente ou podem ser obtidas com a adição de um retrovírus contendo os fatores de transcrição que vai dar origem as iPSCs. (Yamanaka, 2006)

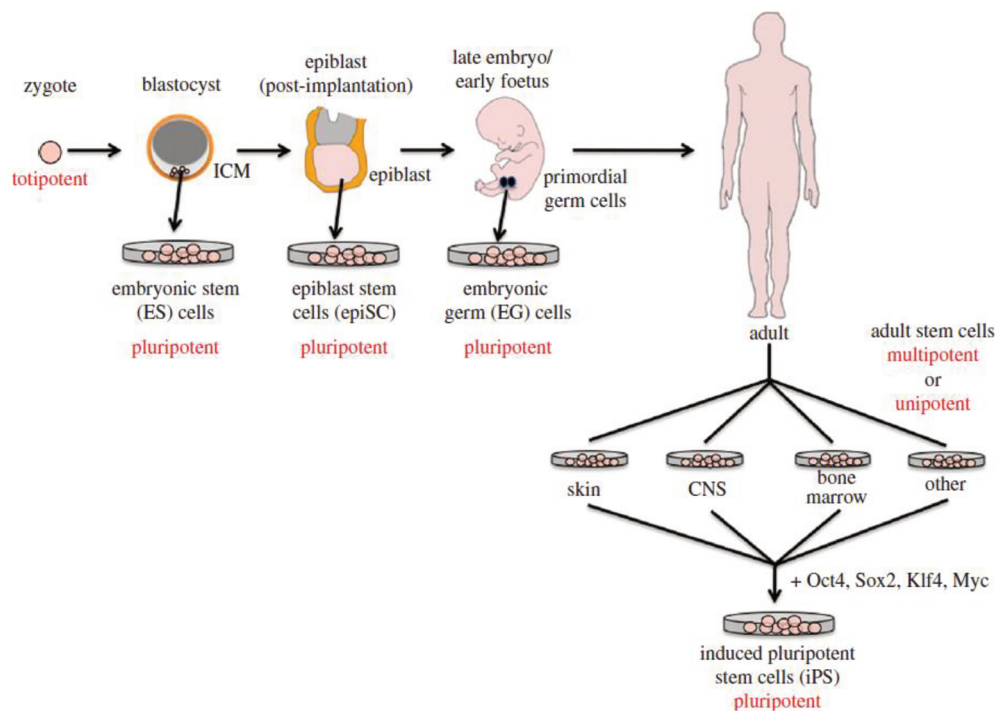


Figura nº2: Potencialidade das células estaminais, adaptado de Yamanaka, 2006

Origem

De acordo com a sua origem, as células estaminais dividem-se em células estaminais embrionárias e células estaminais não embrionárias ou adultas.

Na fase inicial do desenvolvimento do feto as células estaminais embrionárias podem ser isoladas diretamente do embrião, onde se encontram na massa interna do blastocisto embrionário, cuja a sua formação ocorre entre o 4º e o 6º dia após fertilização. Estas células detêm uma grande habilidade de diferenciação, podendo dar início a qualquer célula do corpo humano com a exceção dos tecidos extraembrionários, sendo consideradas pluripotentes. As suas características possibilitam originar descendência mesmo depois de permanecerem um tempo indefinido *in vitro*. Estas células normalmente são isoladas do blastocito, antes da sua implantação no útero, podendo também ser isoladas após implantação do blastocisto designando-se neste caso de células estaminais do epiblasto (EpiSC). As EpiSC têm um potencial de diferenciação mais restrito, embora consigam diferenciar-se em linhagens dos três folhetos germinativos (De Miguel, Fuentes-Julián, & Alcaina, 2010; Pessoa, 2014).

Por outro lado, encontrando-se na maioria dos tecidos responsáveis pela regeneração celular, também conhecidas como células estaminais adultas dispomos das células estaminais não embrionárias. Estas, ocorrem de inúmeros tecidos adultos do organismo sendo exemplos: o cordão umbilical, a pele, os músculos esqueléticos, os rins, a medula óssea, vasos sanguíneos, sangue periférico, líquido amniótico, entre outros. Estes locais contêm populações de células estaminais suficientes para serem ponderadas para um elevado potencial terapêutico. Estas células constituem uma reserva após o nascimento, pois encontram-se em estados de repouso durante longos períodos de tempo, mas pela sua capacidade de se diferenciarem em vários tipos de células, conseguem substituir células danificadas ou destruídas e regenerar os tecidos danificados quando estimuladas por hormonas e/ou fatores de crescimento (Eaves, 2015; Seita & Weissman, 2010).

As células estaminais adultas ou células estaminais somáticas (SSCs) têm propriedades típicas das SCs, incluindo a autorrenovação, diferenciação de múltiplas linhagens e o alto potencial proliferativo (Gargett, 2010). As SSCs incluem as SCs hematopoiéticas, as SCs mesenquimais, SCs do cordão umbilical, entre muitas outras. As que detêm maior valor de caracterização são as que derivam da medula óssea, que são as

SCs hematopoiéticas e as SCs mesenquimais. Estas coexistem de uma forma funcionalmente independente (Wognum & Szilvassy, 2015).

As SCs hematopoiéticas (HSCs – *Hematopoietic stem cells*) que habitualmente são responsáveis por toda a linhagem sanguínea, são fontes tanto de progenitores mieloides originários do sistema sanguíneo (monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos, plaquetas e células dendríticas) como de progenitores linfoides responsáveis pela formação das células do sistema imunitário (linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (*Natural Killer*). Experimentalmente, são células que não aderem a uma superfície, ou seja, são denominadas células não-aderentes (Fabr, 2012; Rocha & Gluckman, 2006).

As HSCs podem também dividir-se em outro grupo, divisão essa que ocorre antes de se dividem em células progenitoras linfoides e células progenitoras mieloides, dividem-se em HSCs de longo período, ou HSCsLt (*Hematopoietic stem cells Long Term*) e HSCs de curto período, ou HSCsSt (*Hematopoietic stem cells Short Term*). As HSCsLt proliferam-se ao longo da vida, mas dividem-se muito raramente, tendo a capacidade quando ativadas, de regenerar todos os tipos de células sanguíneas. Nas HSCsSt a capacidade de renovação é mais limitada, levando-as a ter uma semi-vida de poucos meses. Estas quando se dividem dão origem a uma célula multipotente progenitora, denominada MPP (*Multipotent progenitor cell*) que já não possuem capacidade de autorrenovação, mas estão em constante divisão. Divisão essa que na maioria das vezes aumenta a possibilidade de existirem erros de divisão, levando a malformações de células e a erros de replicação. Tudo isto está associado à ocorrência de neoplasias malignas (Brasileira et al., 2009; Seita, Jun; Weissman, 2010). Todo este complexo processo de divisão está demonstrado na figura nº3.

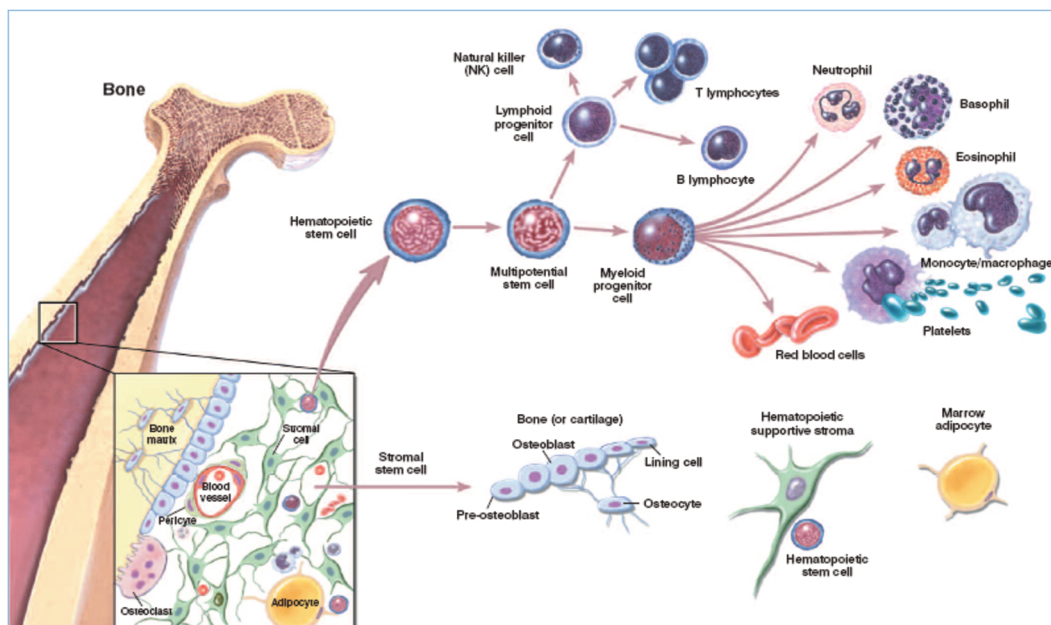


Figura nº3: Processo de divisão das células hematopoiéticas, adaptado de ("hematopoiesis - KEFALIKINISI,")

As MSCs (Mesenquimal Stem Cells), dão origem a diversos tecidos e células, como condroblastos, osteoblastos, células endoteliais e adipócitos. Ao contrário das HSCs são células aderentes e encontram-se em diversos locais do organismo, como o cordão umbilical, a medula óssea, tecido adiposo, entre outros. Apesar da sua origem mesodermal, na presença de condições apropriadas, as MSCs têm a capacidade de se diferenciar em células com origem na ectoderme (neurónios e pele) ou endoderme (hepatócitos, fígado e intestino). Independentemente da sua origem, as MSCs expressam um conjunto de fatores de transcrição e recetores membranares específicos (Mendez-Otero, Giral-di-Guimarães, Pimentel-Coelho, & Freitas, 2009). Experimentalmente, a sua identificação advém do o seu aspeto morfológico (fibroblastos que evoluem aderentes a uma superfície) e de marcadores específicos evidentes na sua membrana (proteínas CD105, CD73, CD90) e a consequente inexistência de marcadores específicos das células HSCs (proteínas CD34 e CD133).

As MSCs são consideradas seguras nas terapias celulares devido ao seu baixo risco em modificações malignas e à sua capacidade de diferenciação. Alguns estudos científicos já relatam a evidência das MSCs de regular a hematopoiese e mediar a resposta imunitária (Kim, Jeon, Yang, Oh, & Chang, 2010; Liras, 2010).

Para além de todas as características mencionadas, as MSCs têm outra função muito importante, quando extraídas com base no sangue do cordão umbilical não detêm um complexo de histocompatibilidade *major* completo, ou seja, não se distinguem os genes dos subgrupos II e um gene do sub-grupo I (HLA-DR). Esta particularidade tem uma grandíssima relevância no que diz respeito à compatibilidade entre o dador e o recetor, pois, mesmo não existindo a compatibilidade entre o dador e o recetor, a probabilidade de provocarem a HvGD e GvHD (reação imunológica entre o excerto e o hospedeiro) é quase nula. Sendo por isso o sangue do cordão umbilical uma das melhores fontes de obtenção de células mesenquimais, pois, além de se encontrarem e maior quantidade também é onde se encontram no seu maior estado de imaturidade (Kim et al., 2010; Liras, 2010).

Em síntese, as SCs de acordo com a sua etapa de evolução preservam particularidades quanto à sua capacidade de renovação e de diferenciação sendo as SCs embrionárias classificadas como as mais indiferenciadas e, por isso, potencialmente aptas de originar um vasto número de células. As células estaminais hematopoiéticas dão origem a tecidos celulares mais limitados.

Células estaminais do sangue do cordão umbilical

Para uma melhor compreensão deste tema é necessária uma abordagem mais específica sobre as células do cordão umbilical. As células estaminais extraídas do sangue do cordão umbilical (UCBSCs – *Umbilical Cord Blood Stem Cells*) são células estaminais adultas e multipotentes, maioritariamente hematopoiéticas. Porém, também já foram obtidas células estaminais mesenquimais a partir do isolamento de células estaminais do sangue do cordão umbilical ainda que em pouca quantidade (Delaney, Ratajczak, & Laughlin, 2010). Na figura nº4 estão expressas as fontes de células estaminais.

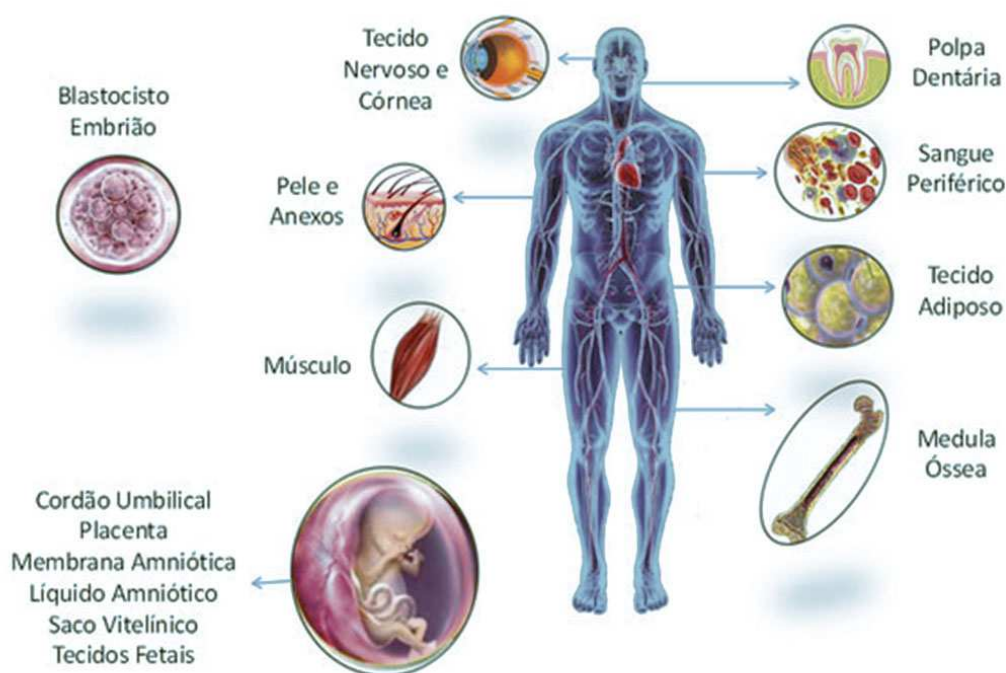


Figura nº4: Principais fontes de células estaminais, adaptado de <https://ccb.med.br/texto/celulas-tronco>

Características

Em comparação com as células estaminais adultas da medula óssea, as UCBSCs têm um menos grau de especialização e por isso têm uma maior capacidade proliferativa, menor reatividade imunológica e menor risco de doença enxerto-hospedeiro do que as células estaminais adultas da medula óssea. Por outro lado, contrariamente às células estaminais embrionárias, as UCBSCs não conseguem originar todos os tipos de células (Trounson, Thakar, Lomax, & Gibbons, 2011).

Anteriormente, apenas os transplantes de medula óssea eram usados para tratar processos de doença em que as células estaminais eram benéficas e eficazes. Atualmente, e contrariamente ao que previamente era conhecido, sabe-se que as UCBSCs têm 10x mais células estaminais do que a medula óssea adulta (Smith & Wagner, 2009).

Segundo, o “Relatório sobre investigação em células estaminais” elaborado por (Regateiro et al., 2005), até à data, existem três âmbitos programáticos de investigação em células estaminais, onde a maioria dos trabalhos realizados que se encontram publicados foram efetuados em modelos e células animais e não em células humanas. São eles:

- ✓ A investigação de células estaminais de origem embrionária (a partir da massa celular interna de embriões gerados por fecundação *in vitro* de um óvulo por um espermatozoide), conseguidas a partir de nado morto, de células tumorais de teratocarcinoma ou carcinomas embrionários, de blastómeros retirados por biopsia de oócitos divididos por partenogénese artificial;
- ✓ A investigação de células estaminais em tecidos adultos;
- ✓ A investigação de células estaminais somáticas resultantes da técnica de clonagem somática

Estes projetos têm como finalidade:

- ✓ Ampliar a percepção dos mecanismos de desenvolvimentos biológicos dos seres vivos, nomeadamente no que diz respeito a processos de diferenciação celular e aos seus mecanismos de controlo;
- ✓ Criar novas *guidelines* através de cultura de células estaminais embrionárias e do controlo de todos os processos de diferenciação e potencialidade para obter tipos específicos de células

Outrora, o cordão umbilical era considerado um desperdício, após acontecer o parto. Hoje em dia sabemos que este órgão extraembrionário é uma fonte preciosa de células estaminais. O cordão umbilical possui duas artérias e uma veia, que são envolvidas por um tecido conjuntivo mucóide, geleia de Wharton (Wharton's gelly). As UCBSCs são extraídas da veia do sangue do cordão umbilical logo após o nascimento. Além das células hematopoiéticas, o cordão umbilical pode ser usado como uma fonte de células endoteliais, células mesenquimais e células estaminais somáticas. O sangue do cordão contém todos os elementos sanguíneos: glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos), plaquetas e plasma, sendo igualmente rico em HSCs, semelhantes às presentes na medula óssea (Fabr, 2012; Malgieri et al., 2010).

A imagem abaixo, figura nº 5, demonstra como é constituído o cordão umbilical. (Flotho et al., 2017)

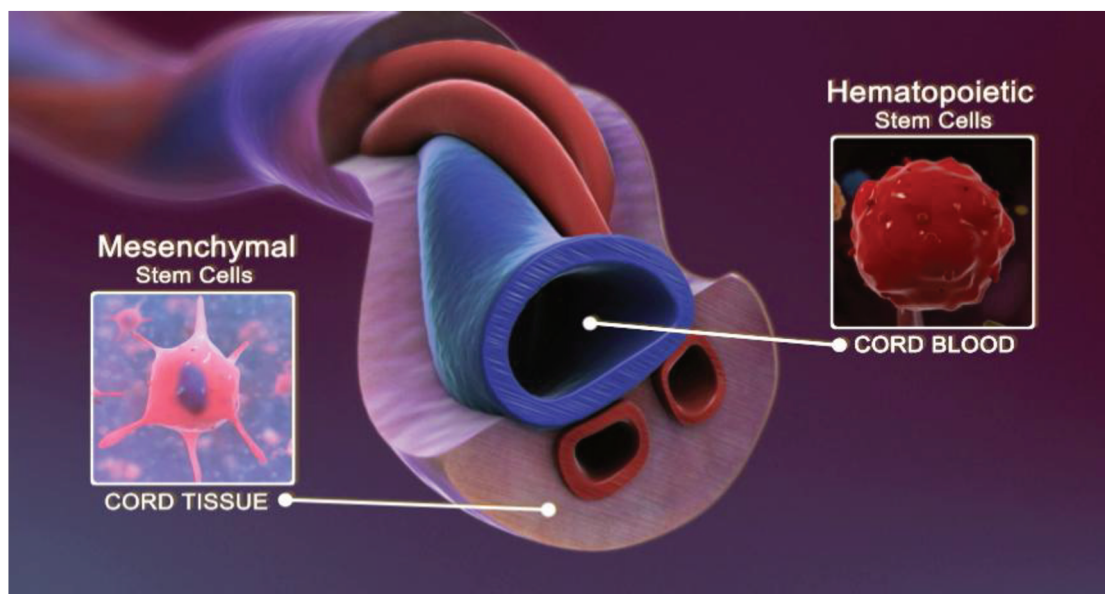


Figura nº5: Constituição do cordão umbilical, adaptado de Flotho et al., 2017

Desde que as UCBSCs surgiram como uma alternativa às células hematopoiéticas da medula óssea têm sido cada vez mais usadas e estudadas. Em 2009 as UCBSCs tornaram-se na segunda maior fonte comum de células progenitoras hematopoiéticas para terapia celular. Em resposta a esse potencial de terapia, um grande numero de bancos privados e públicos de UCBSCs foram estabelecidos em todo o mundo (Ilic et al., 2012).

Só existe, na vida humana, uma oportunidade para a recolha de UCBSCs e esse momento ocorre na altura do parto. A criopreservação das células do sangue do cordão umbilical é um evento crucial para a sua aplicação futura. Esta metodologia deve ser bem efetuada para se obter e preservar o máximo de células, mantendo-as viáveis e aptas a serem utilizadas. Há normas que validam e uniformizam os processos de recolha e criopreservação a fim de permitirem que as amostras fiquem corretamente registadas, conservadas e, também, minimizar possíveis erros de colheita. Estudos demonstram potenciais diferenças entre as UCBSCs e o tecido do cordão umbilical, por isso, existem bancos de recolha que optam por recolher e criopreservar não só o sangue do cordão umbilical bem como o próprio tecido (Conselho da Europa, 2015; Gunning, 2007).

Para realizar a recolha da amostra de UCBSCs e/ou do respetivo tecido do cordão umbilical é necessário a compra de um kit pelos pais. Este kit inclui toda a informação e todas as instruções necessárias para os profissionais de saúde, bem como comunicações

adicionais e referentes documentos para os pais. Este kit vem numa caixa selada com material esterilizado para usar na colheita. Cada kit é adquirido para cada bebé. O kit é transportado pelos adquirentes aquando do dia do parto e entregue aos profissionais de saúde (“Células Estaminais - Crioestaminal,” 2017; Fabr, 2012).

Existem duas práticas para a obtenção das UCBSCs. A primeira colheita é feita quando a placenta permanece no útero e é efetuada por obstetras na sala de partos, no segundo processo a recolha é feita por profissionais do centro de criopreservação escolhido já com placenta no exterior. Muitos são os estudos que verificam o impacto do tipo de colheita executada perante a viabilidade celular. A maioria deles conclui que a primeira recolha referida permite adquirir um maior volume de células viáveis (é calculado por contagem de células $CD34^+$) e minimiza também a adulteração da amostra (Fabr, 2012; Hunt, 2011; Liras, 2010).

Atualmente, o que é maioritariamente realizado é a recolha imediatamente após nascimento do feto, no interior do útero, no ambiente estéril da sala de partos e antes da expulsão da placenta. O cordão umbilical é dividido entre dois grampos (pinças), onde é inserida uma agulha na veia do cordão umbilical, o mais adjacente exequível do local onde se encontra o grampo e o sangue é extraído. O sangue é transferido para um depósito com o anticoagulante citrato-fosfato-dextrose e é acondicionado no kit de criopreservação (K. K. Ballen, 2005; Hunt, 2011; Ilic et al., 2012).

Deve ser extraída a máxima porção de sangue possível, preferencialmente entre 60 a 150 ml. A amostra recolhida é mantida à temperatura ambiente até ser encaminhado para o laboratório de criopreservação. Quando rececionado, é efetuado o registo da amostra e é-lhe, automaticamente, atribuído um código interno. Posteriormente, segue-se um rigoroso controlo de qualidade, onde são avaliados vários parâmetros entre eles: a contagem de HSCs, a partir do cálculo de $(CD34^+)$, o volume da amostra, a sua viabilidade, através do número de células vivas e por fim é feita a avaliação de células mononucleadas com o método de azul triptano ou com iodeto de propídeo (Fabr, 2012; Hunt, 2011).

Após todo o processo de avaliação e apuramento dos parâmetros acima descritos, é feita a divisão das SCs das outras células hematopoiéticas (plaquetas e glóbulos

vermelhos) recorrendo à centrifugação. O método de centrifugação é utilizado porque as células apresentam diferentes densidades moleculares. Depois de estarem isoladas as SCs, é refeita a contagem de células CD34⁺ e células mononucleadas certificando que estas estão em número razoável para garantir o seu posterior uso. São essenciais sensivelmente 15 milhões de células mononucleadas por Kg de peso, se o recolhido for insuficiente e não satisfizer essas condições, os progenitores serão notificados e a criopreservação é considerada inválida (Butler & Menitove, 2011; Fabr, 2012; Hunt, 2011).

Neoplasias

A palavra neoplasia (“*neoplasm*”) expressa “novo crescimento” em Grego, isto refere-se a qualquer crescimento anormal, independentemente de ser benigno ou maligno, ou seja, quando se utiliza o termo Doença Neoplásica estão a ser abrangidas os dois tipos novamente. Todos os tipos de cancro existentes, independentemente do seu tipo englobam-se na categoria de Doenças Neoplásicas malignas. (“Paleo-oncology Research Organization (PRO) | What is Neoplastic Disease?,” 2014)

As neoplasias do sistema imunitário são um conjunto homogéneo de tumores cujas células de origem podem ser linfócitos, os histiócitos (macrófagos inativos) ou outros componentes do sistema imunológico. Cada uma representa um desenvolvimento monoclonal de células malignas, mantendo em si características morfológicas e funcionais dos seus análogos de funcionamento celular normal (Stephen J.; Ganong, 2006). A tabela nº1 enumera as principais neoplasias e as respetivas células de onde são originárias.

Célula de Origem	Neoplasia
<u>I. Célula B</u>	
Célula B medular	Leucemia linfocítica crónica, linfoma linfocítico pequeno difuso
Célula B folicular	Linfomas foliculares, linfoma misto difuso, linfoma de grandes células difuso, linfoma de Burkitt
Células B imunoblásticas	Linfoma imunoblástico difuso
<u>II. Célula T</u>	
Célula T tímica	Linfoma linfoblástico
Célula T madura	Linfomas de célula T periféricas, leucemia linfocítica crónica, linfoma associado ao HTLV-I, micoses fúngicas, síndrome de Sézary
Célula T imunoblástica	Linfoma imunoblástico difuso
<u>IV. Desconhecida</u>	Doença de Hodgkin

Tabela nº1: Principais neoplasias e respetivas células de origem, adaptado de (Dos Anjos et al., 2000)

Segundo a DGS, no relatório “Programa Nacional Para as Doenças Oncológicas, 2017”, Portugal tem seguido a tendência do resto da Europa, tendo sido verificado um aumento da incidência de Cancro em Portugal com uma taxa de crescimento constante de 3% anual, este aumento por ser tão ligeiro não é visível na figura nº6. É também deduzido que essa ampliação se deve, provavelmente à existência de uma elevada percentagem de população envelhecida e ao aumento dos cuidados de saúde e medicamentos que acrescem a longevidade dos indivíduos. Em contraste (dados de 2015) a taxa bruta de mortalidade por Neoplasia Maligna encontra-se nos 2%, inferior à taxa de incidência.

Inferiormente, na figura nº6 é possível observar, com base em dados do Instituto Nacional de Estatística, INE, a evolução das taxas de mortalidade bruta e padronizada por tumores malignos em Portugal, entre os anos 2010 e 2015 (“Portal do Instituto Nacional de Estatística,” 2017).

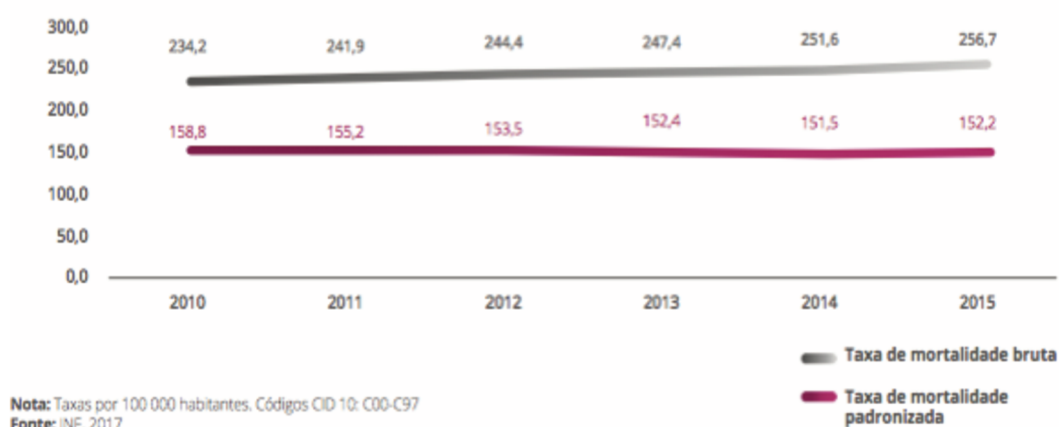


Figura nº6: Evolução das Taxas de Mortalidade Bruta e Padronizada de Tumores Malignos em Portugal (2010-2015) adaptado de “Portal do Instituto Nacional de Estatística”, 2017

A figura nº7 traduz o número de cirurgias Oncológicas realizadas em Portugal, no período de 2010-2015, onde a cirurgia é considerada um dos principais meios de tratamento de bastantes neoplasias. As linhas apresentam um constante crescimento desta atividade. Este aumento visível significa que existe uma maior sensibilidade para a doença, traduzindo assim um maior número de casos diagnosticados e início de

terapêutica, o que de certa forma é um indicador positivo no que toca ao combate destas patologias (“Portal do Instituto Nacional de Estatística,” 2017).



Figura nº7: Número total de cirurgias oncológicas em Portugal (2010-2015), adaptado de “Portal do Instituto Nacional de Estatística”, 2017

Tipos de neoplasias

Existem diversos tipos de Neoplasias, mas para este tema as pertinentes de serem abordadas são: Leucemia, Linfoma e Mieloma múltiplo.

Leucemia

As perturbações malignas do sistema hematopoiético, que atingem a medula óssea e os gânglios linfáticos, são denominadas leucemias. É um tipo de cancro que tem como modelo celular envolvido, o grau de maturação das células. Este género de neoplasia tem como característica alteração da função normal das células sanguíneas, as células hematopoiéticas progenitoras sofrem uma transformação anómala, ficando com um distúrbio funcional, pois não funcionam como deveriam e ocorre uma proliferação incontrolável de leucócitos e seus precursores. Esta proliferação interfere com a produção normal das outras células hematopoiéticas, originando células com anemia, imaturas, etc. A imaturidade das células pode originar dependendo do tipo de célula afetada, dificuldades de oxigenação de tecidos, controlo de hemorragias e combate a infeções (Dos Anjos, Alvares-Silva, & Borelli, 2000).

Embora a sua etiologia ainda seja desconhecida, na maioria dos doentes com leucemia aguda já se encontram descritas algumas relações de predisposição. Doentes

portadores de alterações cromossómicas específicas, como Síndrome de Down, neurofibromatose de Recklinghausen e anemia de Fanconi, exibem uma maior probabilidade de possuírem leucemia aguda. Exposição de carácter crónico a produtos químicos e a fármacos também já se encontram associados ao desenvolvimento desta doença. Em termos de incidência nos adultos ocorre em idades superiores a 55 anos, enquanto que na população pediátrica é o tipo de cancro com maior incidência em crianças abaixo dos 15 anos (“Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute,” 2017; Dos Anjos et al., 2000).

Classificação das leucemias

De acordo com a sua evolução clínica e/ou grau de maturação das células, as leucemias são categorizadas como agudas ou crónicas, e ainda, subdivididas em relação ao tipo de célula que prolifera. Na Leucemia aguda, a multiplicação ocorre seguida de um bloqueio maturativo (anaplasia), deteriorando o estado clínico do doente mais rapidamente, em contraste a Leucemia crónica que se caracteriza por uma proliferação inicial, mas não se encontra associada a um bloqueio maturativo, assim ocorre um crescimento celular diferencial, embora existam diferentes graus de displasia, o que compromete funcionalmente a população celular (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; “Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute,” 2017).

Leucemia Aguda

As Leucemias agudas, são descritas por um acréscimo dos precursores linfóides ou mielóides imaturos (blastos). Estes blastos vão substituindo a medula óssea normal, migram e entram noutros tecidos. Ocorre assim um decréscimo da criação de eritrócitos, granulócitos, plaquetas normais, no caso da leucemia aguda, o que abre portas a dificuldades como infecções e hemorragias. No caso das leucemias agudas são ordenadas de acordo com a célula preponderante na medula óssea, envolvendo, ainda células imaturas. A falha para a ocorrência desta leucemia aparenta iniciar-se com a multiplicação desregulada de células progenitoras multipotentes, que deixam de ter a sua capacidade de se diferenciar em refutação aos estímulos hormonais regulares e às interações celulares. As leucemias agudas são deveras heterogéneas, traduzindo o complexo processo de diferenciação hematopoiética. Os diversos géneros de leucemia aguda são determinados recorrendo a vastos procedimentos que incorporam a morfologia,

histoquímica, marcadores de superfície celular e citoplasmáticos, alterações citoquímicas e genéticas moleculares (Dos Anjos et al., 2000; Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001).

Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

Também denominada de leucemia não linfocítica aguda, é uma neoplasia que ocorre atingindo os tecidos sanguíneos, sobretudo os da medula óssea e dos nódulos linfáticos, é menos comum que a leucemia linfocítica (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012).

É uma patologia causada por uma carcinogênese dos neutrófilos em divisão. A célula irregular maligna, reproduz-se de modo anômalo, criando progressivamente uma quantidade elevada de células leucémicas continuarão a proliferar, sucessivamente, da mesma forma (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; “Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute,” 2017).

Com base na elevada proliferação, estas células iniciam a invasão à medula óssea e comprometem a produção de outras células, nomeadamente, provocam um decréscimo da produção de neutrófilos e de outras células sanguíneas, sobretudo glóbulos vermelhos e plaquetas. Quando atingem a corrente sanguínea continuam com o seu comportamento proliferativo descontrolado, invadindo outros órgãos e tecidos - gânglios linfáticos, baço, fígado, aumentando o volume destes órgãos (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; “Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute,” 2017).

Leucemia linfocítica aguda (LLA)

É uma patologia maioritariamente relacionada com a população jovem e pediátrica. Os doentes afetados apresentam frequentemente anemia, hemorragias ou infecções (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012).

É uma patologia maligna progressiva, que se caracteriza pela formação de uma alteração imatura de células linfocíticas, denominadas comumente de linfoblastos, que reagem de forma irregular aos fatores que regulam o crescimento celular. Estes

linfoblastos anómalos adquirem uma multiplicação incomum e contínua, substituindo os glóbulos brancos funcionalmente normais que combatem infecções (alteração denominada de granulocitopenia), ou glóbulos vermelhos (levando a anemia) e plaquetas (causando trombocitopenia). É detectável também um grande número destas células irregulares na medula, corrente sanguínea e no fluido circundante do cérebro e espinal medula. Estas células, através da corrente sanguínea podem atingir outras estruturas como os testículos e nódulos linfáticas, causando nestes um intumescimento (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Pui, 2009).

Na leucemia linfocítica aguda, as células malignas dissipam a sua capacidade de maturação e diferenciação, permanecendo num estado de multiplicação constante, substabelecendo as células funcionalmente regulares. Disfunções cromossomais também podem ser responsáveis na propagação da leucemia aguda (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Pui, 2009).

A alteração ocorre maioritariamente nos linfócitos, tanto nos B como nos T, mas na forma aguda ocorre em cerca de 80 a 85% das vezes e as alterações ocorrem na linhagem de linfócitos B. Existem três subtipos de LLA considerados importantes na linhagem B: os precursores primitivos dos linfócitos B; os precursores B; e os provenientes de células B. O subtipo precursor primitivo B é encontrado em sensivelmente 80% dos doentes com ALL (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Pui, 2009).

As células da leucemia linfocítica aguda juntam-se em três tipos de ALL: L1, L2 e L3. As L1 e L2 como têm determinadas particularidades semelhantes, terão uma terapêutica semelhante (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Pui, 2009).

O subtipo L1 é o que têm a morfologia mais frequente das ALL e detém o prognóstico mais favorável. As células L1 são blastos de tamanho pequeno e com quantidade de citoplasma escassa. Habitualmente possuem um núcleo circular (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Pui, 2009).

O sub tipo L2 está frequentemente mais presente nos adultos com ALL. As células L2 são superiores às L1 e têm um citoplasma superior. Modificam-se significativamente

entre si e têm um núcleo assimétrico. O menos comum dos subtipos, é o L3, surge apenas em 7% dos adultos e em 2% da população pediátrica com ALL. As células são mais desenvolvidas e o citoplasma é granuloso com grandes vacúolos (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Pui, 2009).

Leucemias crónicas

Leucemia Mielóide Crónica (LMC)

A forma crónica de leucemia tem origem numa célula progenitora mieloide. Neste tipo de leucemia as células conservam a sua capacidade de diferenciação sendo capazes de sustentar as funções indispensáveis das células hematopoiéticas normais as quais substituem na medula óssea. Nesta a multiplicação de células mielóides e progenitoras é demasiada. A carência de habilidade de diferenciação apenas ocorre em estadios mais avançados da doença (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Vonka & Petráčková, 2015).

A doença inicia-se de um modo semelhante ao da leucemia mielóide aguda, com adulteração maligna dos neutrófilos. As células modificadas proliferam descontroladamente, ampliando o seu número e disseminando-se com auxílio da corrente sanguínea, onde pode atingir um número 20 vezes superior ao normal. Alguns neutrófilos excedentários permanecem a desempenhar a função de proteção do organismo contra infeções, ou seja, imunidade diminuída não é uma característica deste tipo de leucemia.

No entanto, à medida que as células malignas se propagam pela medula óssea, vão bloquear a produção normal de glóbulos vermelhos. Ocasionalmente, ocorre a infiltração dos neutrófilos provocando a ampliação de volume de vários órgãos, como o baço, os gânglios linfáticos e o fígado (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Vonka & Petráčková, 2015).

Leucemia linfocítica crónica (LLC)

A leucemia linfocítica crónica é uma neoplasia monoclonal, usualmente de linfócitos B imunologicamente irregulares (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Scarfò, Ferreri, & Ghia, 2016).

Por norma ocorre em doentes de idade madura, conduz-se num formato geralmente benigno, contudo, a sua velocidade de desenvolvimento não é padronizável. O diagnóstico é demorado, por causa da sua velocidade e da ausência sintomatológica. Normalmente é descoberta através da extensão extrema de linfócitos e posterior infiltração na medula óssea, em conjunto com as características morfológicas e de imunofenótipo (técnica utilizada para identificação de qual o tipo exato de célula que compõe um determinado tecido) (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Scarfò et al., 2016).

Na sua globalidade, a LLC é consequente de uma linfoproliferação maligna monoclonal dos linfócitos B, apesar de uma mínima proporção dos casos possa surgir dos linfócitos T. Os linfócitos B leucémicos propagam-se demoradamente, o que acontece igualmente com os linfócitos B normais e em outras neoplasias como no mieloma múltiplo e na maioria dos linfomas modulares (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Scarfò et al., 2016).

A maioria dos linfócitos da LLC são compostos por células pequenas, que se encontram em estado quiescente (G0). Na maior parte dos casos, só um estreito número é constituído por linfócitos de tamanho intermédio ou grande, onde existem linfócitos que se encontram em estágios distintos do ciclo celular, dispondo-se para a divisão (Scarfò et al., 2016).

As células desta leucemia apresentam defeitos imunológicos e têm uma resposta lenta à mitogénese e a estímulos imunológicos (Scarfò et al., 2016).

Segundo os dados do IPO de Lisboa Francisco Gentil, E.P.E., abaixo está descrito a epidemiologia destas leucemias (Conde, 2011).

Leucemia linfóide aguda - LLA

- Representa 85% dos casos de LLA infantil a nível mundial,
- Incidência anual: 0.7/100,000 adultos e de 2/100,000 na população pediátrica.

Leucemia mielóide aguda - LMA

- Representa 80% de todas as Leucemias mielóides agudas do adulto, 10-15% das leucemias na população pediátrica;

- Incidência anual: 2.3/100,000 adultos e 1/100,000 na população pediátrica.

Leucemia mielóide crônica - LMC

- Representa 15% de todas as leucemias no adulto e menos de 5% na população pediátrica;
- Ocorre em cerca de 1-1.5/100,000 adultos por ano.

Linfoma

Ao aglomerado de neoplasias do sistema linfático, mais propriamente dos linfócitos, dá-se o nome de linfoma. Estas células são encontradas usualmente nos gânglios linfáticos e nos restantes tecidos que tenham convivência com o exterior tais como o tubo digestivo, os pulmões, a pele, entre outros (Küppers, Dührsen, & Hansmann, 2014).

Os gânglios são estruturas que se encontram repartidas por todo o organismo, tendo como função a defesa do organismo contra qualquer tipo de agente infeccioso que consiga penetrar na pele ou em tecidos próximos do meio extrínseco (Küppers et al., 2014).

Nesta patologia certas células do sistema linfático multiplicam-se descontroladamente surgindo tumores sólidos, que surgem normalmente nos tecidos periféricos linforreticulares dos nódulos linfáticos, como por exemplo nos intestinos, pele e faringe, entre outros (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012).

Já se reconhece que determinadas toxinas presentes no ar, como os pesticidas podem motivar linfomas. A comunidade científica também crê que alguns vírus e bactérias estão na origem da doença. Doentes com o vírus HIV, o VEB (Epstein-Barr), ou que tomem medicação imunossupressora têm uma probabilidade eminente de desenvolver algum tipo de linfoma. Cerca de 30% com SIDA desenvolvem linfoma (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012).

Os linfomas divergem em linfomas de Hodgkin (LH) e de Não-Hodgkin (LNH), distinguindo-se, apenas, pelo tipo de célula. Os sintomas são bastante similares, como

inchaço indolor dos nódulos linfáticos, febre e fadiga. Alterações cromossômicas, na sua maioria são translocações, são frequentes nos LNH. (Küppers et al., 2014).

No LH, os gânglios periféricos afetados, são normalmente os gânglios cervicais ou os localizados por cima da clavícula. Porém, no LNH apenas são afetados os gânglios por cima e por baixo do diafragma, além de outros tecidos linfoides (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012).

Linfoma Não-Hodgkin (LNH)

Linfoma-Não-Hodgkin constitui a patologia com mais ocorrências de neoplasias do sistema imunitário, que engloba mais de dez entidades patológicas distintas umas das outras. Os LNH são um grupo heterogêneo de doenças malignas cujo ponto idêntico prende-se com uma expansão monoclonal própria dos linfócitos B ou T malignos (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Küppers et al., 2014).

Linfoma de Burkitt

Este linfoma é uma neoplasia rara do linfócito B monoclonal de elevada relevância biológica. É um tumor sólido de linfócitos B que se caracteriza por pequenas células não divididas, com morfologia uniforme. É um linfoma que aumenta com uma velocidade superior, conseguindo duplicar-se a cada 24h. É um linfoma de elevada importância, foi o primeiro tumor humano a ter associação positiva com um vírus e um dos primeiros que demonstraram ter uma translocação cromossomal que ativa um oncogene. (Molyneux et al., 2012)

A primeira descrição deste linfoma, data de 1958, por Denis Parsões Burkitt como uma neoplasia maligna da mandíbula. Foi descrito novamente, em 1965, por O'Connor como um linfoma com particularidades histopatológicas análogas (Rochford & Moormann, 2015).

Este linfoma está relacionado com a desregulação da expressão do gene c-myc, induzida pelo vírus EBV; que impossibilita as células de cessarem o ciclo celular, mantendo-as em divisão continua. As células malignizadas exprimem uma grande

quantidade de proteína c-myc, normalmente relacionada com a translocação cromossómica recíproca que afeta o locus c-myc (Said, Lones, & Yea, 2014).

Através da Tabela nº2 é possível ver os dados fornecidos pela DGS no relatório “Programa Nacional para as Doenças Oncológicas, 2015”, por ser um dos considerados por esta entidade como dos mais relevantes daí fornecer neste relatório dados relativos à mortalidade de doentes com esta patologia. É possível concluir que no período 2008-2012 houve um aumento de óbitos do sexo feminino e masculino. Havendo maior número de óbitos no sexo masculino estes foram os únicos que tiveram uma diminuição e depois um aumento. Apesar da oscilação no sexo masculino a sua taxa de óbitos à data de 2012 encontrava-se na taxa dos 7.2% enquanto que o sexo feminino se encontrava nos 6.2%.

Linfoma não-Hodgkin					
	2008	2009	2010	2011	2012
Ambos os sexos					
Número de óbitos	593	604	663	663	664
Taxa de mortalidade	5,9	6,0	6,6	6,6	6,6
Taxa de mortalidade padronizada	4,0	3,9	4,2	4,0	3,9
Sexo masculino					
Número de óbitos	327	317	364	343	341
Taxa de mortalidade	6,8	6,6	7,6	7,2	7,2
Taxa de mortalidade padronizada	5,2	4,9	5,4	5,0	4,9
Sexo feminino					
Número de óbitos	266	287	299	320	323
Taxa de mortalidade	5,1	5,5	5,7	6,1	6,2
Taxa de mortalidade padronizada	3,0	3,1	3,2	3,2	3,2

Taxas: por 100 000 habitantes. Códigos da CID 10: C82, C83, C85.

Tabela nº2: Indicadores de mortalidade relativos ao Linfoma não-Hodgkin em Portugal, adaptado da DGS.

Linfoma de Hodgkin

Este linfoma é uma alteração maligna única, originada nos nódulos linfáticos e possui um aspeto histopatológico característico. É determinada pela observação da célula gigante de Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS), num meio celular adequado. É uma patologia que afeta cerca de 9000 novos doentes anualmente. Esta doença representa cerca de 11% de todos os linfomas nos EUA. A distribuição desta doença apresenta um padrão bimodal, ou seja, significa que afeta jovens na adolescência e início dos anos 20 e analogamente verifica-se em indivíduos com idade superior a 55 anos. A etiologia deste permanece desconhecida, embora existam fatores associados a um risco de desenvolver a doença aumentado, como infeções virais, fatores genéticos familiares e imunossupressão (“The Hodgkin and Reed/Sternberg cell,” 2005).

O vírus de Epstein-Barr é um dos vírus que se encontra presentemente com relação positiva no que toca ao desenvolvimento deste linfoma, estudos demonstraram a presença do genoma deste vírus em amostras de tumores deste tipo (Ansell, 2015).

Na figura abaixo, figura nº8, podemos observar uma coloração avermelhada de células HRS, uma visão histológica (“The Hodgkin and Reed/Sternberg cell,” 2005).

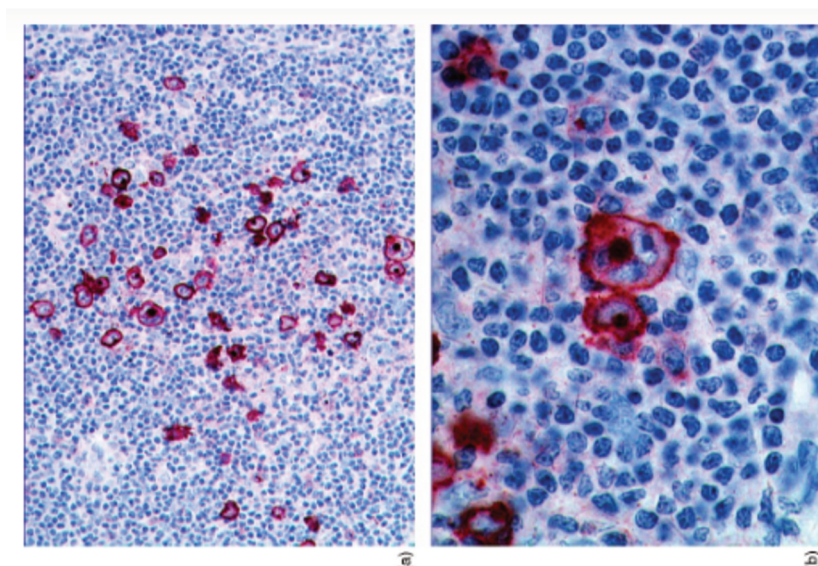


Figura nº8: Células HRS (a) Secção de um nódulo linfóide recorrendo a coloração imuno-histoquímica. Células HRS coradas a vermelho. (b) Visão histológica de uma célula HRS e células CD30 coradas. (“The Hodgkin and Reed/Sternberg cell,” 2005)

Segundo a Agência Internacional para a pesquisa na área da oncologia, EUCAN, as estimativas de incidência em 2012 para Portugal estão visíveis na tabela nº3 e discriminada por sexo para uma análise mais completa. É possível inferir desta tabela que para o ano de 2012, os membros do sexo masculino tiveram uma prevalência e taxa de mortalidade superior aos membros do sexo feminino.

	Incidência		Mortalidade		Prevalência
	nº	taxa	nº	taxa	
	287	2.7	59	0.4	205
Sexo Feminino	139	2.7	24	0.3	91
Sexo Masculino	148	2.7	35	0.5	114

Tabela nº3: Dados da EUCAN das estimativas de incidências, mortalidade e prevalência em 2012, do linfoma de Hodgkin em Portugal (Ferlay et al., 2013)

Mieloma Múltiplo

Também denominado de mieloma plasmocitário, mielomatose ou doença de Kahler. É a manifestação mais comum de neoplasia de células plasmáticas, sendo a responsável por cerca de 1% de todas as doenças malignas. O plasmócito com a anomalia multiplica-se na medula óssea, levando a uma desordem funcional da medula óssea, bem como a invasão do tecido ósseo adjacente (Rajkumar & Kumar, 2016).

Nesta patologia existe destruição óssea, hipercalcemia, anemia, deterioração da função renal, imunodeficiência e déficit do sistema imunitário permitindo a entrada de doenças oportunistas. Afeta predominantemente a população envelhecida, daí a sua idade de diagnóstico média rondar os 60 anos de idade (“Multiple Myeloma Symptoms, Prognosis, Stages, Treatment & Survival Rate,” 2017; Rajkumar & Kumar, 2016).

No plasma encontram-se as proteínas derivadas dos linfócitos B, originados nos gânglios linfáticos e medula óssea. Cada linfócito B é responsável por produzir uma imunoglobulina ou um anticorpo. Existem 5 tipos de imunoglobulinas (Igs): IgA, IgE, IgD, IgG e IgM. Cada uma contém duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Rajkumar & Kumar, 2016).

No mieloma, há uma produção excessiva de uma das Igs havendo depleção da formação das outras. É denominada como a paraproteína. O mieloma é classificado com base na imunoglobulina produzida pelas células malignas. Caracteristicamente, no mieloma produtor de imunoglobulina IgG esta só tem uma cadeia pesada e uma leve, ao contrário do normal que deveria possuir duas de cada (Rajkumar & Kumar, 2016).

É uma patologia que passa muitas vezes despercebida, pois pode estar presente no doente sem ocorrência de diagnóstico por períodos longos, ou seja, pode-se considerar assintomático. Para que seja diagnosticado têm de estar presentes 2 das 3 observações: lesões radiológicas características (lesões ósseas circulares), número aumentado de células plasmáticas imaturas, com irregularidades atípicas na medula óssea, presença da paraproteína monoclonal no sangue e/ou urina (“Multiple Myeloma Symptoms, Prognosis, Stages, Treatment & Survival Rate,” 2017; Rajkumar & Kumar, 2016).

As imunoglobulinas monoclonais vulgarmente segregadas no mieloma, são as IgM, as IgG e as IgA, ou as cadeias livres de Ig. A constante presença destes tipos distintos de doenças plasmáticas é descrito como sendo ajustado às suas concentrações séricas e às suas taxas globais de síntese (Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, 2012; Rajkumar & Kumar, 2016).

Segundo a Agência Internacional para a pesquisa na área da oncologia EUCAN, as estimativas de incidência em 2012 para Portugal estão visíveis na tabela nº4 e discriminadas por sexo para uma análise mais completa. É possível concluir que a tendência dos três parâmetros (incidência, mortalidade e prevalência) é semelhante em ambos os sexos.

	Incidência		Mortalidade		Prevalência
	nº	taxa	nº	taxa	
	513	3.3	365	2.1	344
Sexo Feminino	245	2.8	184	1.9	162
Sexo Masculino	268	3.9	181	2.5	182

Tabela nº4: Dados da EUCAN das estimativas de incidências, em Portugal, mortalidade e prevalência em 2012 do Mieloma Múltiplo e outras doenças imunoproliferativas. (Ferlay et al., 2013)

Transplantação

De acordo com a definição do serviço nacional de saúde, SNS, “um transplante é a transferência de células, tecidos ou órgãos vivos de uma pessoa (o doador) para outra (o recetor) ou de uma parte do corpo para outra (por exemplo, enxertos de pele) com a finalidade de restabelecer uma função perdida”. O transplante pode trazer enormes benefícios às pessoas afetadas por doenças que, de outro modo, seriam incuráveis.

Em crianças a transplantação de sangue do cordão umbilical exhibe uma sobrevivência superior ou semelhante à conferida em transplantes de células hematopoiéticas obtidas por outras fontes e os efeitos no caso de adultos prosseguem os seus estudos e são cada vez mais utilizados (Conselho da Europa, 2015).

Anualmente, são diagnosticados milhares de doentes com patologias tratáveis a partir de transplantes com HSCs. Sempre que transplantadas as SCs restabelecem a medula óssea do utente, multiplicando e diferenciando-se não só em células sanguíneas imaturas, mas igualmente em células adultas e funcionais (Conselho da Europa, 2015; Fabr, 2012).

A transplantação de HSCs é atualmente a única terapia disponível para pacientes com disfunções hematológicas e do sistema imunitário, tal como, mielomas, leucemias, linfomas e neoplasias mieloproliferativas. Os doentes com este prognóstico médico realizam elevadas doses de quimioterapia e radioterapia de forma a suprimir as células sanguíneas afetadas pela doença (Conselho da Europa, 2015).

As três principais fontes de HSCs obtidas para transplantação são:

1. SCs retiradas da medula óssea, colhidas através da anca do paciente, principal origem de HSCs nos últimos anos.
2. Sangue Periférico. Para recolher as HSCs do sangue, são aplicados fármacos ao doador de forma a persuadir a autonomia das células da medula óssea na corrente sanguínea, podendo ser facilmente recolhidas por um processo denominado aférese (separação dos constituintes sanguíneos)
3. Sangue do cordão umbilical.

Visão Global

Antes de transplantar qualquer tipo de tecido, tem de existir um processo de correspondência para aumentar o sucesso do transplante e diminuir a probabilidade de o transplante ser rejeitado. A rejeição de um tecido transplantado é chamada “doença de hospedeiro versus enxerto” (*Host versus Graft Disease*, HvGD). O processo de correspondência remonta à década de 1950, quando os antígenos leucocitários humanos (HLA) foram descobertos. Existem duas classes de HLA, uma localizada na superfície de quase todas as células com núcleo e outra encontrada na superfície das células imunitárias. Cada uma das duas classes de HLA tem três subclasses, criando seis antígenos para os quais a correspondência pode ocorrer. Assim, havendo uma combinação “6 de 6” é considerada uma correspondência perfeita. Além do processo de correspondência outros fatores contribuem para o sucesso ou para a falha do transplante com células estaminais. Estes fatores incluem, a idade do doador e do paciente, o tipo de doença a ser tratada e o número de HSCs a serem transplantadas (Copelan, 2006; Moise, 2005). Na figura abaixo, figura nº9, estão relatados os números de transplantes de HSCs de 1988 até 2006 nos EUA.

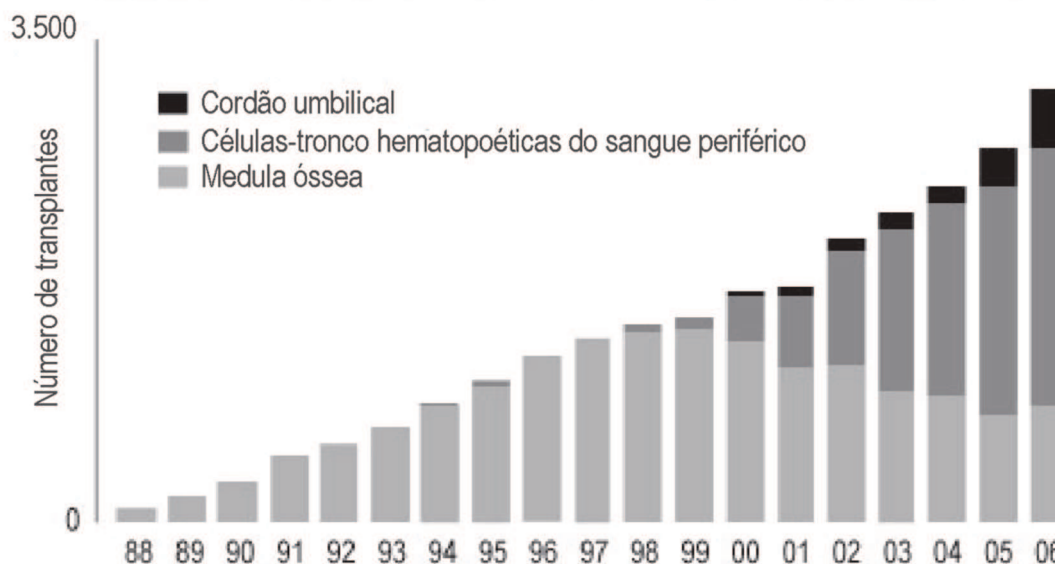


Figura nº9: Transplantes de HSCs (1988-2006) nos EUA, adaptado de National Marrow Donor Program (NMDR) (EUA)

Autotransplante

Os transplantes autólogos ou autotransplantes são transplantes onde as células a serem recolhidas são extraídas da medula óssea, do sangue ou do sangue do cordão umbilical da própria pessoa. As células são adquiridas, criopreservadas e de novo usadas pelo doador. Nestes casos não há normalmente uma rejeição ao transplante pois o risco de ocorrer uma reação autoimune é muito baixa (Fabr, 2012).

Para o autotransplante, as HSCs geralmente são congeladas a temperaturas inferiores a -120 ° C e são usadas em poucas semanas, embora, quando congeladas, sejam viáveis por anos (Copelan, 2006; Eaves, 2015).

A grande desvantagem neste tipo de transplantes é que a maioria das patologias associadas à necessidade destes transplantes já se encontra também afetada por células tumorais ou outro tipo de células inadequadas provocada pela doença. Nestas situações a amostra adquirida é normalmente exposta a fármacos citotóxicos e futuramente administrada no seu próprio doador (Fabr, 2012; Kim et al., 2010; Smith & Wagner, 2009).

A possibilidade de usar as UCBSCs para utilização própria é muito reduzida, situando-se entre 0,04% e 0,0005%. Os doentes que necessitam de um transplante carecem, na generalidade, de células de um dador compatível e não das suas próprias células. O autotransplante de UCBSCs não é efetivo na terapia da generalidade das doenças uma vez que as células estaminais já exibem as mesmas transformações genéticas que o doente detém (Fabr, 2012; Mendrone Junior, 2009; Smith & Wagner, 2009).

Alotransplante

O transplante alogénico, ou alotransplante é um transplante realizado utilizando as células de outra pessoa (membros da família ou doadores não relacionados) tornando-se viável na década de 60, após reconhecimento e observação do principal complexo de histocompatibilidade, HLA. Os genes para o HLA estão inteiramente ligados ao cromossoma 6 e são herdados como haplótipos. Portanto, no caso de serem dois irmãos, tem cerca de $\frac{1}{4}$ de hipótese dos HLA serem idênticos. Na década de 1970 Thomas e os seus colaboradores trataram alguns pacientes que apresentavam leucemia em estágio IV usando a medula dos seus irmãos que tinham HLA idênticos com a administração simultânea de ciclofosfamida (citotóxico). O transplante durante a primeira remissão da leucemia foi bem-sucedido em mais de metade dos doentes. A ocorrência de GvHD reduziu a probabilidade de reincidência, o que sugeriu que os linfócitos doados podem suprimir as células tumorais que sobrevivem aos regimes antecedentes. Todo esse trabalho foi a base para a compreensão atual do transplante de HSCs (Copelan, 2006; Ilic, Miere, & Lazic, 2012; Smith & Wagner, 2009).

Aplicações Terapêuticas

Existem inúmeras aplicações terapêuticas recorrendo à transplantação de UCBSCs. O primeiro transplante recorrendo às UCBSCs foi reportado no final da década de 1980. Foi o caso de um menino americano de 6 anos da Carolina do Norte que tinha uma anemia de Fanconi, uma desordem genética. Este foi transplantado com o sangue do cordão umbilical adquirido a partir do nascimento da sua irmã mais nova. Após um ano, 98% do seu sistema linfático era proveniente das células transplantadas. Presentemente, está bem, conseguindo não só sobreviver durante mais tempo, bem como o sistema hematopoiético foi restabelecido e renovado pelas UCBSCs da irmã. Após este episódio o primeiro banco público de UCBSCs foi estabelecido em Nova York em 1991 e 1993 ocorreu o primeiro transplante alotransplante numa criança de 4 anos com leucemia (Forraz & McGuckin, 2011; Waller-Wise, 2011).

Posteriormente, os bancos públicos obtiveram mais de 500 000 cordões umbilicais voluntariamente, de doadores anónimos e de forma gratuita. Já se realizaram mais de 25 000 transplantes autólogos de doadores não relacionados em todo o mundo (K. K. Ballen, 2005; Petrini, 2013).

A utilização de UCBSCs ganhou importância devido ao excesso de carências de doadores para alotransplante verificado nos últimos 40 anos. Nesse tempo, quase 2/3 não possuía doador familiar compatível, daí se tornar indispensável existirem doadores não relacionados. Desde o começo dos transplantes recorrendo às HCs tornou-se evidente que o sangue do cordão umbilical é uma fonte segura e eficaz de SCs para transplantação. Em 2008, conforme o National Marrow Donor Program dos Estados Unidos, existiam mais de 260 mil unidades de sangue do cordão umbilical armazenadas em diversos bancos. Ainda que a medula óssea seja a fonte mais predominante de SCs para transplantação, o sangue do cordão umbilical tem adquirido muita relevância e interesse nos últimos anos (IOM, 2007; Kaimal, Smith, Laros Jr., Caughey, & Cheng, 2009; Nishihira, 1996; Waller-Wise, 2011).

Quando as UCBSCs são doadas para banco públicos, a identificação de informações é removida e as amostras podem ser usadas para qualquer pessoa que necessite. Na maioria dos bancos públicos, o critério para uma unidade de UCBSCs a ser considerada para armazenamento é ter mais que 10^9 células nucleadas, que normalmente podem ser obtidas apenas se o volume de UCBSCs recolhido for maior do que 90 ml (uma média de 107 células nucleadas por ml de UCBSCs coletadas). Devido a um número insuficiente de células nucleadas, 60% das UCBSCs reservadas é descartado. O limite mínimo de um transplante ótimo de UCBSCs é $2,5-5,0 \times 10^7$ células nucleadas totais a dividir pelos kg de peso corporal do receptor mais o HLA apropriado corresponde a uma UCBSCs (Ilic et al., 2012; IOM, 2007).

Atualmente, a rede mundial de bancos de UCBSCs tem um inventário estimado de 600 000 unidades e mais de 20 000 unidades foram distribuídas e utilizadas em tratamentos (IOM, 2007; Kaimal et al., 2009).

Nos transplantes realizados com UCBSCs, o HLA não requer uma completa correspondência entre doador e receptor, porque estas células são menos passíveis de originar uma reação imunitária em relação às da medula óssea. A imunidade destas células está relacionada com sua baixa imunogenicidade e promove uma baixa hipótese de recusa de um transplante (Malgieri, Kantzari, Patrizi, & Gambardella, 2010; Siddiq et al., 2009).

As UCBSCs podem atualmente ser utilizadas para terapêutica de várias patologias malignas e não malignas, sobretudo doenças hematopoiéticas. Têm sido utilizados, com êxito em autotransplantes e alotransplantes em mais de 70 terapias nos últimos 15 anos (Lim, Inoue-Yokoo, Tan, Lai, & Sugiyama, 2013).

Avanços científicos relatam que a taxa de rejeição de transplantes com UCBSCs é duas vezes inferior à taxa de rejeição para transplantes com medula óssea. Após um transplante de UCBSCs, há menos dos pacientes com GvHD e, entre os pacientes que desenvolveram GvHD, a complicação tendia a ser menos grave do que em pacientes que tinham transplantes de medula óssea ou sangue periférico (K. K. Ballen, 2016; Flotho, Sommer, & Lübbert, 2017; Moise, 2005; Nishihira, 1996; Rocha & Gluckman, 2005).

Ballen em 2016, obteve dados passíveis para a utilização de UCBSCs em doenças autoimunes como lúpus, esclerose múltipla e esclerose sistémica. Por outro lado, Gunning (2007) investigou a utilização das UCBSCs em doenças degenerativas como o enfarte do miocárdio, derrame cerebral, diabetes, doenças hepáticas e doenças neuro-degenerativas. Ainda assim, o uso das UCBSCs nestas doenças ainda está numa etapa exclusivamente empírico, sem dados clínicos e credíveis para a aplicação clínica (Fabr, 2012; Mendrone Junior, 2009).

Em Portugal, o primeiro transplante recorrendo às UCBSCs foi realizado em 1994 no Instituto Português de Oncologia de Lisboa, para o tratamento de uma criança com leucemia mielóide crónica (Fabr, 2012).

Na figura abaixo, figura nº10, está demonstrado o número de unidades de cordão umbilical armazenados em bancos de criopreservação, de 1993 até 2012 (Kiatpongsan, 2008).

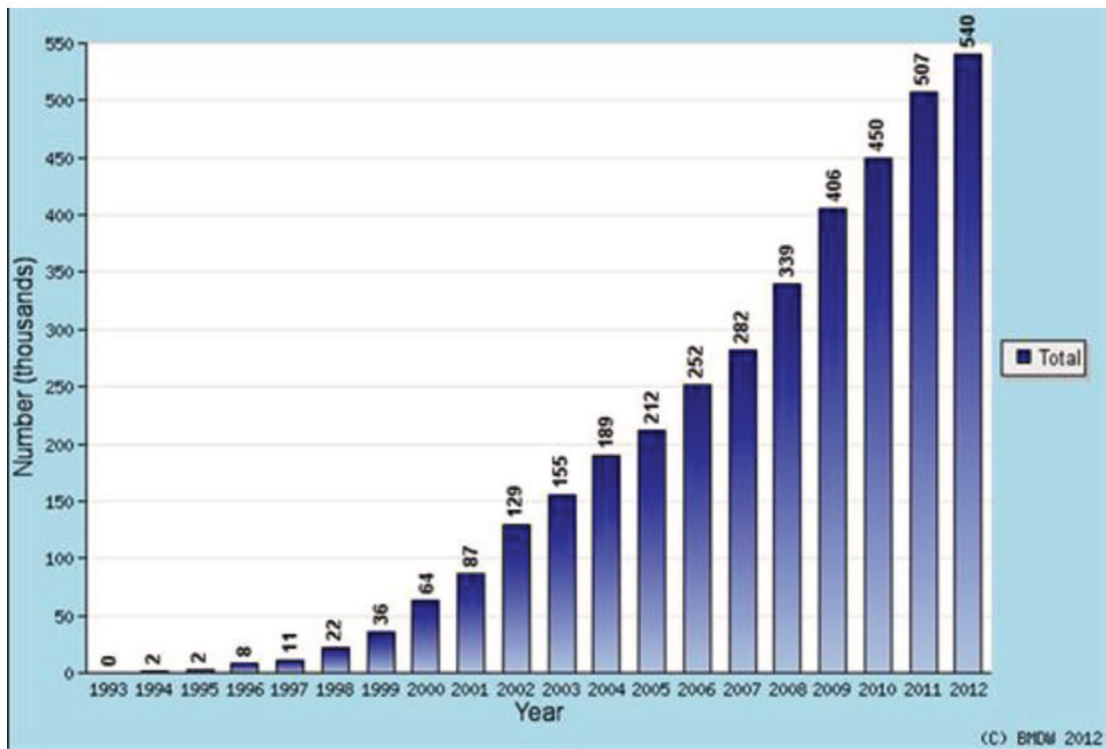


Figura nº10: Número de unidades de cordão umbilical armazenados por ano, a nível mundial, adaptado de (Kiatpongsan, 2008)

Terapia celular com células do cordão umbilical

A terapia celular surge como uma perspectiva da medicina futurista nomeadamente destinada à reparação e regeneração de tecidos e órgãos por transplantação de células com capacidade de exercer a mesma função do que o tecido lesado. O uso de células estaminais obtidas de tecidos adultos já é recorrente na prática clínica, sendo restrito às situações específicas tais como os transplantes com células da medula óssea em portadores de doenças hematopoiéticas. Simultaneamente as células do sangue do cordão umbilical criopreservadas têm sido usadas com sucesso em tratamentos de algumas doenças hematopoiéticas quando não existe medula óssea compatível para excerto alogénico. Apesar disto, não existem estudos científicos suficientes quanto à viabilidade e sustentabilidade após largos anos de conservação no frio (Abdulrazzak, Moschidou, Jones, & Guillot, 2010).

Aplicações clínicas

Para que a recolha do sangue do cordão umbilical seja efetuada são necessárias algumas diretrizes: Antes ou imediatamente após a recolha do sangue do cordão umbilical e da placenta, a mãe deve assinar um termo de consentimento informado, o sangue é colhido imediatamente após o parto, é colhido por punção da veia do cordão umbilical e acondicionado numa seringa ou recipiente próprio, normalmente, englobada no kit de criopreservação anteriormente adquirido, a manipulação é usualmente executada em 24h, onde são realizados testes de controlo de qualidade, remoção de plasma e glóbulos vermelhos, de modo a limitar o volume da amostra, e as HSCs são armazenadas e criopreservadas em nitrogénio líquido. A criopreservação das UCBSCs é um fator indispensável para a viabilidade do uso em bancos de sangue do cordão umbilical (Kaimal et al., 2009; Rocha & Gluckman, 2005; Waller-Wise, 2011).

Consideram-se quatro principais grupos de doenças tratados recorrendo a transplantação com UCBSCs são eles: as neoplasias, doenças hematopoiéticas, doenças metabólicas congénitas e imunodeficiências. Temos como exemplo de neoplasias tratados com UCBSCs o linfoma (ex. Hodgkin e não-Hodgkin) e a leucemia (ex. linfoblástica aguda, mieloide aguda e mieloide crónica). De doenças hematopoiéticas, a

anemia aplásica e a anemia de Fanconi. As células estaminais são também usadas para tratar várias doenças metabólicas, como a adrenoleucodistrofia, doença genética rara ligada ao cromossoma X alterando a mielina (proteína essencial ao correto funcionamento do sistema nervoso e das sinapses) e posteriores perdas de funções do sistema nervoso, atingindo, assim, o sistema nervoso, as glândulas adrenérgicas e os testículos. Na categoria de imunodeficiências temos como exemplo a Doença de Duncan, síndrome relacionada com o cromossoma X e referida à falha de resposta imune por infecção pelo vírus de Epstein-Barr, surgindo em rapazes. Caracteriza-se pela associação de mononucleose infecciosa, linfoma maligno de células B, aplasia medular e hipogamaglobulinemia (aumento anormal da imunoglobulina M (IgM)) (Doyonnas et al., 2005; Waller-Wise, 2011; Weiss & Troyer, 2006).

Apesar de no capítulo referente às neoplasias terem sido apenas mencionadas as consideradas principais no sucesso da transplantação, neste capítulo a tabela nº5 abrange todas as doenças com aplicações terapêuticas possíveis com UCBSCs (Fabr, 2012; <http://bebevida.com/pt/>, 2017; Moise, 2005; Waller-Wise, 2011).

Neoplasias	Doenças hematopoiéticas	Doenças metabólicas congénitas	Imunodeficiências
<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia linfoblástica aguda • Leucemia mieloide aguda • Leucemia mielóide crónica • Síndrome mielodisplásico • Tumores sólidos (Neuroblastoma, Retinoblastoma) <ul style="list-style-type: none"> • Doença de Hodgkin • Linfoma não Hodgkin • Linfoma de Burkitt 	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia aplásica • Anemia de Fanconi • Talassemia • Síndrome de Evan • Anemia falciforme • Anemia de Diamond-Blackfan • Doença de Glanzmann (desordem plaquetária) • Pancitopénia 	<ul style="list-style-type: none"> • Adrenoleucodistrofia • Doença de Gunther • Doença de Gaucher • Síndrome de Hurler • Síndrome de Hunter • Doença de Krabbe • Síndrome de Sanfilippo • Doença de Tay-Sachs • Síndrome de Maroteaux-Lamy 	<ul style="list-style-type: none"> • Imunodeficiência severa combinada • Deficiência da Adenosina Deaminase • Síndrome de Wiskott-Aldrich's • Doença de Duncan • Hipogamaglobulinemia

Tabela nº5: Doenças com aplicações terapêuticas possíveis com UCBSCs. (Fabr, 2012; <http://bebevida.com/pt/>, 2017; Moise, 2005; Waller-Wise, 2011)

Vantagens

Existem várias vantagens no uso do transplante das UCBSCs em relação a outras fontes como é o caso a medula óssea ou sangue periférico. Por exemplo, o facto de o sangue do cordão umbilical ser relativamente fácil de coletar e armazenar e o processo associado à sua colheita ser não invasivo e ser indolor. Depois do sangue do cordão umbilical ser extraído e corretamente armazenado é enviado para um banco de preservação e estará disponível rapidamente para o uso dentro de dias ou algumas semanas após o seu processamento (Gonzalez-Ryan et al., 2001; Waller-Wise, 2011).

Em contraste com a medula óssea, as células estaminais retiradas desta fonte podem demorar entre semanas a meses. Transplantes de medula óssea, por outro lado, exigem que o doado seja hospitalizado, anestesiado e o procedimento é invasivo e cria dor e desconforto ao doador. Além disso o processo de colheita de medula óssea é muito mais dispendioso (Doyonnas et al., 2005; Moise, 2005; Percer, 2009).

Outra das vantagens de usar as UCBSCs é o risco diminuído de transmissão de doenças infecciosas. Sendo este benefício mais específico no caso do vírus de Epstein-Barr ou citomegalovírus, pois o sangue do cordão umbilical raramente é afetado pelo mesmo. O processamento do sangue do cordão umbilical inclui um rastreio inicial essencial à sua recolha. Ou seja, se a mulher grávida tiver histórico de contaminação com *streptococcus B*, herpes genital ativo ou inflamação das membranas placentárias e/ou do líquido amniótico, o sangue do cordão umbilical não é preservado. Usualmente, as amostras sanguíneas da mãe também são necessárias e importantes para testar doenças infecciosas, como a hepatite, vírus da imunodeficiência humana e sífilis (Doyonnas et al., 2005; Gonzalez-Ryan et al., 2001; Waller-Wise, 2011).

Se depois de serem recolhidas e testadas, as UCBSCs forem consideradas contaminadas e/ou infectadas são imediatamente inutilizadas e removidas do armazenamento, por não estarem viáveis a serem transplantadas (Gunning, 2007).

As UCBSCs também são menos prováveis de serem rejeitadas em transplante que as células da medula óssea. A sua baixa imunogenicidade associada à sua imaturidade, produz significativamente menos células NK naturais, cria uma diminuição substancial da rejeição. Consequentemente, as UCBSCs requerem um número de HLA coincidente menos rigoroso do que comparado ao da medula óssea (K. K. Ballen, 2016; Waller-Wise, 2011).

As UCBSCs ficam armazenadas durante algum tempo num banco de dadores, existindo um registo informático de todos as UCBSCs disponíveis, visando diversidades étnicas e um aumento do número de haplótipos raros. (K. K. Ballen, 2016; Moise, 2005)

A tabela nº6 resume as principais vantagens da utilização de UCBSCs (Fabr, 2012; Waller-Wise, 2011).

Vantagens da utilização de UCBSCs
<ul style="list-style-type: none">✓ Fácil recolha✓ Menor risco tanto para a mãe como para a criança✓ Menor risco e desconforto para o doador✓ Menor tempo de processamento, mais rapidamente disponível✓ Menos custo que o transplante de medula óssea✓ Menor risco de contaminação por vírus✓ Não requer alta compatibilidade HLA✓ Menor GVHD✓ Maior probabilidade de transplantes autólogos se UCBSCs recolhidas à nascença✓ Maior diversidade genética das UCBSCs armazenadas

Tabela nº6: Vantagens da utilização de UCBSCs, adaptado de Fabr,2012

Desvantagens

Apesar dos seus inúmeros benefícios, as UCBSCs também possuem algumas desvantagens. Para a transplantação de células estaminais ser bem-sucedida é necessária a existência de marcadores que demonstrem que o transplante foi aceite e está a funcionar. Dois desses marcadores são a recuperação de neutrófilos e a produção de plaquetas. Estes dois sinais clínicos demoram mais tempo a ocorrer em transplantes com UCBSCs do que em transplantes com células estaminais provenientes da medula óssea. O número de células progenitoras hematopoiéticas e células estaminais hematopoiéticas no sangue do cordão umbilical comparadas com a medula óssea ou o sangue periférico é muito menor (Forraz & McGuckin, 2011; Waller-Wise, 2011).

A dose celular é relacionada ao volume de sangue do cordão umbilical retirado. A dose celular refere-se à quantidade útil de células estaminais na amostra de sangue. Por causa da limitação do volume de células recolhidas a partir do sangue do cordão umbilical, estas são aproximadamente 10% inferiores à quantidade obtida da medula óssea. Uma unidade de UCBSCs contém normalmente 50 a 200ml de sangue. Se a quantidade de UCBSCs retirada for inferior a esse volume mínimo, a unidade é descartada e considerada como insatisfatória porque a dose celular não seria alta o suficiente. A

coleta de um volume insuficiente de UCBSCs ocorre em cerca de 50% ou mais dos casos. Se for retirado o máximo de volume de células e o receptor necessitar de volume adicional, já não é possível obter mais células porque o volume de células é uma quantidade limitado. (Gonzalez-Ryan et al., 2001; Moise, 2005).

Outra das desvantagens não é bem compreendida pela maioria das pessoas e também chega a não ser bem explícita nas informações que se encontram disponíveis para o público. Isto porque o departamento de marketing dos bancos de UCBSCs anunciam o sangue do cordão umbilical como sendo um “seguro biológico”. No entanto, a hipótese de uma criança poder usar as suas próprias UCBSCs é extremamente pequeno, de 1:200.000 durante a vida da criança. Na verdade, existem certos casos em que o uso das próprias UCBSCs é contraindicado, como nos casos em que o defeito é de origem genética. Como as UCBSCs são colhidas logo após o nascimento são desconhecidas informações relativas ao sistema imunológico e/ou hematopoiético do doador, tais como as possíveis irregularidades do desenvolvimento. Por exemplo, os transplantes autólogos com UCBSCs não podem ser usados para tratar neoplasias malignas como a leucemia, porque as mutações genéticas de certas neoplasias malignas já estão presentes no DNA do sangue do cordão umbilical. Usando as próprias UCBSCs seria contaminar a pessoa com o mesmo processo da doença. Outra das considerações importantes para os transplantes autólogos é que atualmente não se sabe quando tempo as UCBSCs se manterão viáveis e utilizáveis enquanto congeladas. Certas pesquisas realizadas indicam que as UCBSCs podem ser mantidas até 15 anos, mas é desconhecida a evidência que as células poderiam ser preservadas toda a vida dessa pessoa (K. Ballen, 2007; Endy, 2005; Gonzalez-Ryan et al., 2001; Percer, 2009; Sullivan, 2008).

Além disso, uma outra desvantagem são os custos financeiros que estão associados com a manutenção do sangue do cordão umbilical ao longo do tempo. Kaimal e co-autores (2009) exprimiram a relação custo-eficácia de um banco de UCBSCs privado para uso autólogo e concluíram que não era rentável na maioria dos casos, porque as chances de viabilidade eram extremamente pequenas.

Finalmente há uma significativa falta de regulamentação para os bancos de UCBSCs. A falta de normas de controlo de qualidade, por sua vez, afeta a qualidade da peça transplantada. Alguns bancos submeteram-se a uma acreditação voluntária, mas o

processo de acreditação varia de banco para banco. (Forraz & McGuckin, 2011; Moise, 2005) Na tabela abaixo estão enumeradas de forma mais resumida e esquemática as desvantagens da utilização das UCBSCs.

Desvantagens da utilização das UCBSCs
<ul style="list-style-type: none">▪ Pequeno volume disponível▪ Maior tempo de regeneração do tecido hematopoiético do receptor▪ Impossibilidade de usar UCBSCs da mesma amostra no caso da primeira transplantação não seja bem-sucedida▪ Longevidade das UCBSCs ainda pouco investigada (mantidas até 15 anos)▪ Se a história genética for desconhecida há risco de transferência de doenças genéticas▪ A hipótese de uma criança poder usar as suas próprias UCBSCs é de 1:200.000

Tabela nº7: Desvantagens da utilização de UCBSCs adaptado de Fabr,2012.

Resultados

Encontram-se, atualmente em Portugal, pelo menos 8 bancos de UCBSCs, um dos quais público. Na grande maioria a recolha é feita tanto ao nível das UCBSCs bem como do tecido do cordão umbilical. A ordem dos advogados, em fevereiro de 2012, publicou que apenas 4 desses bancos eram autorizados e certificados pela Direção Geral de Saúde, DGS, de modo a que os remanescentes não satisfaziam os requisitos legais impostos pela mesma, com base na lei 12/2009, mas encontravam-se a funcionar. Essa mesma lei, realizada em 26 de Março regula o regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana (Fabr, 2012; Gunning, 2007; Querol et al., 2009; Sullivan, 2008).

Em 2005, *Vanderson Rocha* e *Eliane Gluckman*, com o apoio da *Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group* analisaram a eficácia do transplante de UCBSCs em crianças recorrendo a alotransplantes, em comparação com a transplantação da medula óssea. Embora seja necessário um acompanhamento mais longo com transplante de UCBSCs, os dados do estudo sugerem que em alotransplantes de irmãos com HLA idênticos, o transplante de UCBSCs é tão útil como o de células estaminais da medula óssea. Aconselhando a recolher e criopreservar as UCBSCs em caso de famílias

com historial de doenças genéticas e/ou hematológicas. Expõem, também que as UCBSCs podem ser consideradas como uma fonte válida e fidedigna para alotransplantes de crianças com doenças metabólicas e distúrbios malignos que precisem de um transplante com HSCs e não possuem um HLA idêntico. Reunidos todos os dados, as UCBSCs são uma alternativa que deve ser considerada ao transplante de medula óssea e apoiam a procura de doadores independentes de células do cordão umbilical. No caso de crianças que necessitem de um transplante urgente, as UCBSCs são a melhor opção (Rocha & Gluckman, 2005).

Conclusão

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados não só de modo a fortalecer a utilização de células do sangue do cordão umbilical bem como criar terapêuticas inovadoras com as células estaminais. Estudos esses, que se revelaram sendo uma boa aposta a sua utilização e tendo cada vez mais importância e interesse, pois alguns mostraram-se bastante eficazes. (Wognum & Szilvassy, 2015)

Existem muitas aplicações científicas possíveis para as HSCs, de destacar algumas como o estudo da função do sistema hematopoiético, principalmente na vida fetal e neonatal, bem como a diferenciação das HSCs e a forma como se relacionam com os tecidos envolventes, no entanto ainda é necessário prosseguir os ensaios e pesquisas de modo a tornar válidos alguns dos seus resultados na prática clínica (Fabr, 2012).

A utilização de UCBSCs é bastante aconselhada no caso de patologias, em que seja necessário a prévia destruição parcial ou total do sistema hematopoiético dos indivíduos, transformando o processo menos tóxico e mais eficiente. Também podemos encontrar bastante procura na utilização de UCBSCs na melhoria da prevenção do GVHD, através do uso de citocinas imunomoduladores e infusão de células T regulatórias com recurso à terapia génica (Eaves, 2015).

As perspectivas futuras contam com avanços científicos na utilização de SCs como uma nova fonte de HSCs. Refere-se também uma melhor compreensão de todos os mecanismos moleculares envolvidos na divisão celular e de que forma se consegue interferir num formato mais ordenado no incentivo da regeneração tecidual, na concordância entre a autorrenovação e diferenciação celular e na determinação de normas mais claras e coesas sobre a forma de utilização da terapia células com células do sistema hematopoiético e a terapia génica para a melhoria da qualidade de vida dos doentes (Eaves, 2015).

A Leukemia & Lymphoma Society está a dar maior destaque a ensaios referentes ao transplante de UCBSCs. Estão a decorrer ensaios clínicos de fase II e III, de forma a ampliar o número de SCs em cada unidade de sangue do cordão umbilical para possibilitar tanto a adultos e a jovens, de modo a otimizar o seu resultado após transplante de UCBSCs (Fabr, 2012).

Em novembro de 2011, a US Food and Drug Administration aprovou o Hemacord, como sendo a primeira terapia com UCBSCs, indicadas em caso de transplante de HSCs para pacientes com patologias do sistema hematopoiético. Como uma fonte rica de HSCs progenitoras, as UCBSCs possuem um forte potencial regenerativo na terapia baseada em células estaminais. Embora os transplantes com UCBSCs possam melhorar os sintomas e as condições da maioria dos pacientes, é, no entanto, ainda muito precoce que estas suportem uma cura para transtornos não-hematológicos. Embora as UCBSCs tenham inúmeras vantagens, o seu baixo rendimento em cada transplantação é ainda considerado um grande inconveniente, também o facto de existirem poucos estudos *in vitro* e *in vivo* que incentivem a sua utilização em pacientes adultos também se torna uma desvantagem considerável (Przepiorka, 2011).

Em suma, a recolha de UCBSCs é um processo relativamente simples, que poderá ser muito útil no futuro, por isso, é uma decisão sensata a colheita das células estaminais no momento do parto, por profissionais de saúde especializados e a sua criopreservação num banco de células à escolha dos progenitores.

Bibliografia

- Abdulrazzak, H., Moschidou, D., Jones, G., & Guillot, P. V. (2010). Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl_6), S689–S706. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0347.focus>
- Ansell, S. M. (2015). Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 90(11), 1574–1583. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.005>
- Ballen, K. (2007). Targeting the stem cell niche: squeezing blood from bones. *Bone Marrow Transplantation*, 39(11), 655–660. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705651>
- Ballen, K. K. (2005). New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4125>
- Ballen, K. K. (2016). Review in translational hematology New trends in umbilical cord blood transplantation Preclinical studies, 105(10), 3786–3793. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4125.Reprints>
- Brasileira, R., Hematologia, D., & Review, R. (2009). Células-tronco hematopoéticas : utilidades e perspectivas, 53–58. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000032>
- Breu, F., Guggenbichler, S., & Wollmann, J. (2008). Considerações Sobre Células-Tronco Embrionárias. *Vasa*, 19(3), 303–313. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Butler, M. G., & Menitove, J. E. (2011). Umbilical cord blood banking: An update. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(8), 669–676. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9577-x>
- Cecil, R. L. 1., Goldman, L., MD., & Schafer, A. I. (2012). *Goldman's Cecil medicine* (24th editi).
- Células Estaminais - Crioestaminal. (2017). Retrieved November 20, 2017, from <http://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais/>
- Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute. (2017). Retrieved November 21, 2017, from <https://www.cancer.gov/>
- Conde, J. (2011). Instituto Português de Oncologia - prospectiva. *Arquivo de Patologia*, XLVI(2 e 3/Agosto Dezembro).
- Conselho da Europa, C. E. para a T. de O. (CD-P.-T. (2015). DE SANGUE DO

CORDÃO UMBILICAL Guia para os Pais.

- Copelan, E. A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 354(17), 1813–1826. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052638>
- De Miguel, M. P., Fuentes-Julián, S., & Alcaina, Y. (2010). Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Reviews*, 6(4), 633–49. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1>
- Delaney, C., Ratajczak, M. Z., & Laughlin, M. J. (2010). Strategies to enhance umbilical cord blood stem cell engraftment in adult patients. *Expert Review of Hematology*. <https://doi.org/10.1586/ehm.10.24>
- Dos Anjos, A. R., Alvares-Silva, M., & Borelli, P. (2000). Matriz Extracelular e Leucemia. *Bras.hematol.hemoter*, 22(3), 404–412. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v22n3/13415.pdf>
- Doyonnas, R., Nielsen, J. S., Chelliah, S., Drew, E., Hara, T., Miyajima, A., & McNagny, K. M. (2005). Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood*, 105(11), 4170–4178. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4077>
- Eaves, C. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125(17), 2605–2614. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>.Lessons
- Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*, 438(7067), 449–453. <https://doi.org/10.1038/nature04342>
- Fabr, A. S. (2012). Células Estaminais do Sangue do Cordão Umbilical - O Farmacêutica informa.
- Fabrizio, A. S. (2012). Células Estaminais do Sangue do Cordão Umbilical - O Farmacêutica informa. Retrieved from [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/24586/1/Ana Fabrizio.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/24586/1/Ana%20Fabricio.pdf)
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374–1403. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Flotho, C., Sommer, S., & Lübbert, M. (2017). Dna-Hypomethylating Agents As Epigenetic Therapy Before and After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Myelodysplastic Syndromes and Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *Seminars in Cancer Biology*.

- <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.011>
- Forraz, N., & McGuckin, C. P. (2011). The umbilical cord: A rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Proliferation*, 44(SUPPL. 1), 60–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00729.x>
- Gargett, C. E. (2010). Stem cells in human reproduction. *Reproduction*, 140(1), 1–2. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0225>
- Gonzalez-Ryan, L., Haut, P. R., Coyne, K., Syckle, K. V, Duerst, R., Haro, D., & Kletzel, M. (2001). Developing a pediatric outpatient transplantation program. The Children's Memorial Hospital experience. *Front Biosci*, 6, G1-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487478>
- Gunning, J. (2007). Umbilical cord cell banking: An issue of self-interest versus altruism. *Medicine and Law*, 26(4), 769–780.
- hematopoiesis - KEFALIKINISI. (n.d.). Retrieved November 23, 2017, from <https://sites.google.com/site/kefalikinisi/home/hematologia/hematopoiesis>
- <http://bebevida.com/pt/>. (2017). No Title. Retrieved from <http://bebevida.com/pt/>
- Hunt, C. J. (2011). Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. <https://doi.org/10.1159/000326623>
- Ilic, D., Miere, C., & Lazic, E. (2012). Umbilical cord blood stem cells: Clinical trials in non-hematological disorders. *British Medical Bulletin*. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds008>
- IOM. (2007). Cord Blood: Establishing a National Hematopoietic Stem Cell Bank Program. *IOM*, 1–40. <https://doi.org/10.17226/11269>
- Jagannathan-Bogdan, M., & Zon, L. I. (2013). Hematopoiesis. *Development*, 140(12), 2463–2467. <https://doi.org/10.1242/dev.083147>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). *Histologia Básica* (11^a). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Kaimal, A. J., Smith, C. C., Laros Jr., R. K., Caughey, A. B., & Cheng, Y. W. (2009). Cost-effectiveness of private umbilical cord blood banking. *Obstetrics & Gynecology*, 114(4), 848–855. Retrieved from <http://linksource.ebsco.com/linking.aspx?sid=OVID:medline&id=pmid:19888044&id=doi:10.1097/AOG.0b013e3181b8fc0d&issn=0029-7844&isbn=&volume=114&issue=4&spage=848&date=2009&title=Obstetrics+&+Gynecology&atitle=Cost-effectiveness+of+private+umbilical+cord+bl>

- Kiatpongsan, S. (2008). Business on hope: a case study on private cord blood stem cell banking. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 91(4), 577–580.
- Kim, J.-Y., Jeon, H. B., Yang, Y. S., Oh, W., & Chang, J. W. (2010). Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World Journal of Stem Cells*, 2(2), 34–38. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i2.34>
- Küppers, R., Dührsen, U., & Hansmann, M.-L. (2014). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *The Lancet Oncology*, 15(10), e435–e446. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70153-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70153-6)
- Lim, W. F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K. S., Lai, M., & Sugiyama, D. (2013). Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 71. <https://doi.org/10.1186/scrt222>
- Liras, A. (2010). Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *Journal of Translational Medicine*, 8(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-131>
- Malgieri, A., Kantzari, E., Patrizi, M. P., & Gambardella, S. (2010). Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: State of the art. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*.
- Mendez-Otero, R., Giraldi-Guimarães, A., Pimentel-Coelho, P. M., & Freitas, G. R. (2009). Terapia celular no acidente vascular cerebral. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 31(55 21), 99–103. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000030>
- Mendrone Junior, A. (2009). Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 31, 19–24. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000026>
- Moise, K. J. (2005). Umbilical Cord Stem Cells. *Obstetrics & Gynecology*, 106(6), 1393–1407. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000188388.84901.e4>
- Molyneux, E. M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., ... Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *The Lancet*, 379(9822), 1234–1244. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61177-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61177-X)
- Multiple Myeloma Symptoms, Prognosis, Stages, Treatment & Survival Rate. (2017). Retrieved November 22, 2017, from https://www.medicinenet.com/multiple_myeloma/article.htm
- Nishihira, H. (1996). Cord blood stem cell transplantation. *Journal of the Japan Society*

- of *Blood Transfusion*, 42(4), 145–151. <https://doi.org/10.3925/jjtc1958.42.145>
- Paleo-oncology Research Organization (PRO) | What is Neoplastic Disease? (2014). Retrieved November 21, 2017, from <https://www.cancerantiquity.org/neoplastic-disease>
- Patel, D. M., Shah, J., & Srivastava, A. S. (2013). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*, 2013, 496218. <https://doi.org/10.1155/2013/496218>
- Percer, B. (2009). Umbilical cord blood banking: Helping parents make informed choices. *Nursing for Women's Health*, 13(3), 216–223. <https://doi.org/10.1111/j.1751-486X.2009.01422.x>
- Pessoa, U. F. (2014). Utilização terapêutica das células estaminais.
- Petrini, C. (2013). Ethical issues in umbilical cord blood banking: A comparative analysis of documents from national and international institutions. *Transfusion*. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03824.x>
- Portal do Instituto Nacional de Estatística. (2017). Retrieved November 21, 2017, from https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpgid=ine_main&xpid=INE
- Przepiorka, D. (2011). CLINICAL AND STATISTICAL JOINT REVIEW. Retrieved from <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM282823.pdf>
- Pui, C.-H. (2009). *Seminars in Hematology, Acute Lymphoblastic Leukemia*.
- Querol, S., Mufti, G. J., Marsh, S. G. E., Pagliuca, A., Little, A.-M., Shaw, B. E., ... Madrigal, J. A. (2009). Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? *Haematologica*, 94(4), 536–541. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.002741>
- Rajkumar, S. V., & Kumar, S. (2016). Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(1), 101–119. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.11.007>
- Regateiro, F., Soares, J., Antunes, J. L., Fevereiro, P., Cabral, R. A., & Renaud, C. M. (2005). *RELATÓRIO SOBRE INVESTIGAÇÃO EM CÉLULAS ESTAMINAIS*. Retrieved from http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1273054467_P047_RelatorioCE_VersaoFinal.pdf
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer,

- and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105–11.
<https://doi.org/10.1038/35102167>
- Rocha, V., & Gluckman, E. (2005). Clinical Use of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.09.006>
- Rochford, R., & Moormann, A. M. (2015). Burkitt's Lymphoma (pp. 267–285). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_11
- Said, J., Lones, M., & Yea, S. (2014). Burkitt Lymphoma and MYC. *Advances In Anatomic Pathology*, 21(3), 160–165.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a92cde>
- Scarfò, L., Ferreri, A. J. M., & Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 104, 169–82.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.06.003>
- Seita, Jun; Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(6), 640–653.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.86>
- Seita, J., & Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*.
<https://doi.org/10.1002/wsbm.86>
- Siddiq, S., Pamphilon, D., Brunskill, S., Doree, C., Hyde, C., & Stanworth, S. (2009). Bone marrow harvest versus peripheral stem cell collection for haemopoietic stem cell donation in healthy donors. In D. Pamphilon (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD006406.pub2>
- Smith, A. R., & Wagner, J. E. (2009). Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: Place of umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07828.x>
- Stein, G. S., Borowski, M., Luong, M. X., Shi, M.-J., Smith, K. P., & Vazquez, P. (2010). *Human Stem Cell Technology and Biology: A Research Guide and Laboratory Manual*. *Human Stem Cell Technology and Biology: A Research Guide and Laboratory Manual*. <https://doi.org/10.1002/9780470889909>
- Stephen J.; Ganong, W. F. M. (2006). *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine* (5th Editio).
- Sullivan, M. J. (2008). Banking on cord blood stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 823–823. <https://doi.org/10.1038/nrc2418-c3>

- The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. (2005). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(3), 511–517. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2003.10.025>
- Trounson, A., Thakar, R. G., Lomax, G., & Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Medicine*, 9(1), 52. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-52>
- Vonka, V., & Petráčková, M. (2015). Immunology of chronic myeloid leukemia: current concepts and future goals. *Expert Review of Clinical Immunology*, 11(4), 511–522. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1019474>
- Waller-Wise, R. (2011). Continuing Education Module Umbilical Cord Blood: Information for Childbirth Educators. *The Journal of Perinatal Education*, 20(201), 54–60. <https://doi.org/10.1891/1058-1243.20.1.54>
- Watt, F. M., & Driskell, R. R. (2010). The therapeutic potential of stem cells, 155–163. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0149>
- Weiss, M. L., & Troyer, D. L. (2006). Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Reviews*, 2(2), 155–62. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>
- Weissman, I. L. (2000). Stem Cells : Units of Development , Units of Regeneration , and Units in Evolution, 100, 157–168.
- Welniak, L. A., Blazar, B. R., & Murphy, W. J. (2007). Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141606>
- Wognum, A. W., & Szilvassy, S. J. (2015). Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stemcell Technologies*, (April).
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.012>